



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 29 647 T2** 2005.07.07

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 936 929 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 29 647.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/18631**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 945 578.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/016268**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.10.1997**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **23.04.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.08.1999**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **23.06.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.07.2005**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **A61L 27/00**  
**A61L 24/00**

(30) Unionspriorität:

<b>732016</b>	<b>16.10.1996</b>	<b>US</b>
<b>729344</b>	<b>16.10.1996</b>	<b>US</b>
<b>729343</b>	<b>16.10.1996</b>	<b>US</b>

(73) Patentinhaber:

**Etex Corp., Cambridge, Mass., US**

(74) Vertreter:

**BEETZ & PARTNER Patentanwälte, 80538  
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**LEE, D., Dosuk, Brookline, US; REY, Christian,  
F-31320 Castanet, FR; AIOLOVA, Maria, Brookline,  
US; TOFIGHI, Aliassghar, Belmont, MA 02178, US**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung von wenigkristallinem Calciumphosphat und Verfahren zu dessen Verwendung**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

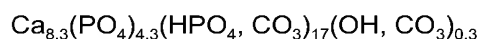
## Beschreibung

## GEBIET DER ERFINDUNG

**[0001]** Die Erfindung bezieht sich auf Materialien für Hartgewebeimplantate, die wenigkristallines apatitisches Calciumphosphat enthalten und die für orthopädische und dentale Anwendungen oder für andere Zwecke als Biokeramiken verwendbar sind, die Menschen oder Tieren implantiert werden können. Die Erfindung bezieht sich ferner auf bioresorbierbare Verbundwerkstoffe, Zelltherapie und Abgabesysteme für therapeutische Substanzen, die für die humane und tierische Therapie zweckdienlich sind.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Calciumphosphate sind der Hauptbestandteil von Hartgeweben (Knochen, Knorpel, Zahnschmelz und Dentin). Im Allgemeinen kommen Calciumphosphate in biologischen Geweben in apatitischer Form vor. Die Zusammensetzung von Knochenmineral kann beispielsweise durch die folgende Formel dargestellt werden:



**[0003]** Im Gegensatz zu idealstöchiometrischem kristallinen Hydroxyapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) oder stöchiometrischen Apatiten im Allgemeinen ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$ ), die ein Calcium/Phosphat-Verhältnis (Ca/P) von 1,67 aufweisen, handelt es sich bei Knochenmineral um einen nichtstöchiometrischen Apatit. Die Nichtstöchiometrie rührt primär von der Gegenwart von zweiwertigen Ionen, wie beispielsweise  $\text{CO}_3^{2-}$  und  $\text{HPO}_4^{2-}$ , die die dreiwertigen  $\text{PO}_4^{3-}$ -Ionen ersetzen. Die Substitution durch  $\text{HPO}_4^{2-}$ - und  $\text{CO}_3^{2-}$ -Ionen führt zu einer Veränderung des Ca/P-Verhältnisses, wobei das Ca/P-Verhältnis in Abhängigkeit vom Alter und der Knochenstelle im Bereich von 1,50 bis 1,70 schwanken kann. Im Allgemeinen nimmt das Ca/P-Verhältnis mit der Alterung des Knochens zu, so dass anzunehmen ist, dass der Gehalt an Carbonatspezies bei älteren Knochen ansteigt. Natürlich vorkommendes Knochenmineral besteht aus wenigkristallinem Calciumphosphat mit apatitischer Struktur und einer Größe im Nanometerbereich. Das wenigkristalline apatitische Calciumphosphat von Knochen unterscheidet sich von den kristallinen Hydroxyapatiten und nichtstöchiometrischen Hydroxyapatiten, wie in [Fig. 7](#) gezeigt, durch sein unterschiedliches Röntgenbeugungsbild. Das Ca/P-Verhältnis führt zusammen mit der nanokristallinen Größe und der wenigkristallinen Natur zu den speziellen Löslichkeitseigenschaften der Knochenmineralien. Da an Knochengewebe fortwährend Reparaturmechanismen ablaufen, die durch Mineral resorbierende Zellen (Osteoklasten) und Mineral bildende Zellen (Osteoblasten) reguliert werden, ist das Löslichkeitsverhalten der Mineralien für die Aufrechterhaltung eines heiklen Stoffwechselgleichgewichts zwischen diesen Zellaktivitäten wichtig.

**[0004]** Synthetisches Knochentransplantatmaterial, das so hergestellt wird, dass es natürlichen Knochenmineralien sehr ähnlich ist, kann einen brauchbaren Ersatz für natürlichen Knochen darstellen. Durch annehmbare synthetische Knochen können das Problem der Verfügbarkeit und Entnahme von autologem Knochen (patienteneigen) und die Risiken und Komplikationen, die mit allogenen Knochentransplantaten (aus Leichen gewonnener Knochen) verbunden sind, beispielsweise die Risiken einer Virenübertragung, vermieden werden. Ein ideales synthetisches Knochentransplantat sollte wenigstens die folgenden vier Eigenschaften aufweisen: (1) Es sollte chemisch biokompatibel sein; (2) es sollte in einem gewissen Umfang strukturelle Integrität besitzen, damit das Transplantat an der Implantatstelle und intakt bleibt, bis der eigene Knochen des Patienten um das Transplantat herum ausheilt; (3) es sollte resorbierbar sein, damit letztlich der patienteneigene Knochen das Transplantat ersetzt, und (4) da es erforderlich sein kann, in das synthetische Knochenmaterial Zellen und/oder Biomoleküle einzubringen, ist es wünschenswert, dass das Verfahren zum Formen des verwendeten Materials bei niedrigen Temperaturen und chemisch milden Bedingungen durchgeführt werden kann. Ähnliche Kriterien sind auch für andere Hartgewebetransplantate (beispielsweise Knorpelgewebe) wesentlich.

**[0005]** Diese Kriterien können durch ein Material erfüllt werden, bei dem Parameter wie Ca/P-Verhältnisse, Kristallgröße, Kristallinität, Porosität, Dichte, thermische Stabilität und Reinheit des Materials eingestellt sind. Es wurden beträchtliche Bemühungen zur Synthese eines keramischen Materials zur Verwendung als Implantat unternommen, meistens wurden jedoch synthetische Hydroxyapatite verwendet, da ihre chemischen Formeln natürlich vorkommendem Knochenmineral sehr ähnlich sind. R. Z. LeGeros gibt in Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, Karger Pub. Co., New York, 1991 hochkristalline Formen von Hydroxyapatit an, die durch Ausfällen in Lösung und anschließendes Sintern bei hohen Temperaturen (800–1200°C) gebildet werden. Hochtemperaturbehandlungen führen zu hochstöchiometrischem Hydroxyapatit mit Kristallgrößen in der Größenordnung von einigen Mikrometern und einem Ca/P-Verhältnis von 1,67. Ein solcher hochkristalliner Hydroxyapatit ist in vivo im Wesentlichen nicht resorbierbar. Er wird nicht durch lebendes Knochengewebe er-

setzt und bleibt für eine unerwünscht lange Zeitspanne in dem Patienten intakt.

**[0006]** Zahlreiche andere Ansätze zur Herstellung von Knochenersatzmaterial setzten Hydroxyapatit ein, der durch eine Säure-Base-Festkörperreaktion anfänglich kristalliner Calciumphosphat-Reaktanten gebildet wurde. Diese Knochenersatzmaterialien aus Hydroxyapatit haben zuweilen nicht ausreichend reagiert, sind inhomogen und weisen einen signifikanten Anteil an kristallinem Hydroxyapatit auf.

**[0007]** Constantz beschreibt in US-Patent Nr. 4,880,610 die Herstellung von Calciumphosphatmineralien durch Umsetzung von hochkonzentrierter Phosphorsäure mit einer Calciumquelle in Gegenwart einer Base und Hydroxyapatit-Kristallen. Das resultierende Produkt ist ein polykristallines Material, das eine kristalline Form von Hydroxyapatitmineralien enthält. In gleicher Weise offenbart das Patent US 5,053,212 von Constantz et al. die Verwendung einer Säurequelle in Pulverform, um die Verarbeitbarkeit und Mischbarkeit des Säure/Base-Gemisches zu verbessern; es wird jedoch von einem Mischphasen-Calciumphosphatmaterial berichtet, das dem Material aus US 4,880,610 ähnelt. In jüngster Zeit beschreiben Constantz et al. in Science (Vol. 267, S. 1796–9 (24. März 1995)) die Bildung eines Carbonat-haltigen Apatits durch Umsetzung von Monocalciumphosphat-Monohydrat,  $\beta$ -Tricalciumphosphat,  $\alpha$ -Tricalciumphosphat und Calciumcarbonat in einer Natriumphosphatlösung, wobei ein Calciumphosphatmaterial angegeben wird, das immer noch wesentlich kristalliner ist als natürlich vorkommende Knochenmineralien.

**[0008]** In ähnlicher Weise beschreiben Brown et al. in US-Reissue Nr. 33,221 die Umsetzung eines kristallinen Tetracalciumphosphat (Ca/P 2,0) mit sauren Calciumphosphaten. Liu et al. offenbaren in US 5,149,368 die Umsetzung von kristallinen Calciumphosphatsalzen mit einem sauren Citrat.

**[0009]** Einige Knochenfüllmaterialien und Knochenzemente auf Calciumphosphatbasis wurden als "resorbierbar" beschrieben. Im Allgemeinen handelt es sich dabei um Verbindungen, die von Tricalciumphosphat, Tetracalciumphosphat oder Hydroxyapatit abgeleitet sind oder Tricalciumphosphat, Tetracalciumphosphat oder Hydroxyapatit enthalten. Bestenfalls können diese Stoffe als nur schwach resorbierbar angesehen werden. Von diesen haben sich die Tricalciumphosphatverbindungen als die resorbierfähigsten herausgestellt, nach vielen Jahren der Untersuchung werden sie klinisch jedoch noch nicht in großem Umfang verwendet. Die Tricalciumphosphate sind dafür bekannt, dass sie übermäßig lange und einigermaßen unvorhersagbare Resorptionsprofile aufweisen, wobei allgemein für die Resorption mehr als ein Jahr erforderlich ist. Außerdem werden Tricalciumphosphate nicht durch Knochengewebe ersetzt, wenn nicht extrem poröse oder mit Kanälen versehene Proben hergestellt werden. Kürzlich ist man zu dem Schluß gekommen, dass: "Biodegradation of TCP, which is higher than that of Hap [hydroxyapatite] is not sufficient" (Der biologische Abbau von TCP, der besser ist als der Abbau von Hap [Hydroxylapatit] ist ungenügend; Berger et al., Biomaterials, 16: 1241 (1995)). Von Tetracalciumphosphat und Hydroxyapatit abgeleitete Verbindungen sind ebenfalls nur schwach resorbierbar. Füllmaterialien auf Tetracalciumphosphatbasis werden im Allgemeinen über lange Zeitperioden zum Teil resorbiert, beispielsweise 80%ige Resorption nach 30 Monaten (Horioglu et al., Soc. for Biomaterials, 18.–22. März, S. 198 (1995)).

**[0010]** Etwa 30% eines in die Stirnhöhle implantierten mikrokristallinen Hydroxyapatit sind bei Katzen nach 30 Monaten noch vorhanden.

**[0011]** Alle diese Referenzen offenbaren eine chemische Reaktion, die zu einer kristallinen Form von Hydroxyapatit-Feststoffen führt, wobei kristalline Calciumphosphat-Feststoffe umgesetzt werden. Von der Verwendung von amorphen Calciumphosphaten (Ca/P von etwa 1,5) als ein Reaktant wurde nur wenig berichtet, da amorphe Calciumphosphate unter den Calciumphosphaten die am wenigsten verstandenen Feststoffe sind und amorphes Calciumphosphat herkömmlich als ein relativ inerte und unreaktive Feststoff angesehen wird.

**[0012]** Amorphes Calciumphosphatmaterial (ACP) wurde als direkter Precursor für die Bildung von hochkristallinen Hydroxyapatitverbindungen verwendet, wobei üblicherweise Behandlungen bei hohen Temperaturen durchgeführt werden. Solch ein hochkristallines Material ist für synthetische Knochen ungeeignet, da es unter physiologischen Bedingungen in hohem Maße unlöslich ist. Chow et al. beschreiben in dem Patent US 5 525 148 die Prüfung von ACP-Precursoren in einigen Reaktionsabläufen, sie geben jedoch an, dass Aufschlämungen von verschiedensten kristallinen Calciumphosphaten mit ACP entweder alleine oder in Gemischen nicht zu einem abbindenden Zement führen oder nicht als wirksames remineralisierendes Mittel wirken.

**[0013]** Brown et al. beschreiben in US-Reissue Nr. 33,221 die Bildung von kristallinem Hydroxyapatit für Dentalzemente durch Umsetzung einer amorphen Phase, die spezifisch auf Tetracalciumphosphat (Ca/P von 2,0) beschränkt ist, mit mindestens einem saureren Calciumphosphat. Brown et al. offenbaren jedoch nicht die Her-

stellung oder die Eigenschaften von solchen Tetracalciumphosphaten in amorphem Zustand. Tung offenbart in US 5 037 639 die Verwendung und Anwendung einer Standardpaste von amorphem Calciumphosphat zur Remineralisierung von Zähnen. Tung schlägt die Verwendung von gewöhnlichem inerten Calciumphosphat vermischt mit und abgegeben durch einen Kaugummi, eine Mundspülung oder eine Zahncreme vor, das sich beim Eindringen von oralen Flüssigkeiten in kristallines Fluorid umwandelt, das Hydroxyapatit enthält, welches zur Remineralisierung von Zahnschmelz brauchbar ist. Simkiss beschreibt in PCT/GB93/01519 die Verwendung von Inhibitoren, wie Mg-Ionen oder Pyrophosphat, die mit amorphem Calciumphosphat vermischt und in lebende Gewebe implantiert werden. Durch Auswaschen beispielsweise von Mg-Ionen in die umgebenden Körperflüssigkeiten wandelt sich das amorphe Calciummagnesiumphosphat in eine kristallinere Form um.

**[0014]** Es gibt weiterhin den Bedarf für die Entwicklung neuer synthetischer Materialien, die den Eigenschaften von natürlich in Hartgeweben vorkommenden Mineralien noch näher kommen können. Es besteht insbesondere immer noch ein Bedarf für synthetische Knochenmaterialien, die vollständig bioresorbierbar sind, die bei niedrigen Temperaturen gebildet werden können und wenigkristallin sind und bei denen es sich um Kristalle mit einer Größe im Nanometerbereich handelt.

### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0015]** Die vorliegende Erfindung gibt ein bioaktives keramisches Material an, das biokompatibel und resorbierbar ist und bei Umgebungstemperatur über einen langen Zeitraum verarbeitet werden kann. Das bioaktive keramische Material kann bei niedrigen Temperaturen geformt werden, es ist leicht formbar und/oder injizierbar und kann jedoch durch Härten nach weiterer Reaktion sehr fest werden. Das bioaktive keramische Material enthält als Feststoff wenigkristallines apatitisches Calciumphosphat mit Ca/P-Verhältnissen, die den natürlich vorkommenden Knochenmineralien ähnlich sind, das eine Steifheit und Bruchfestigkeit ähnlich wie natürliches Knochengewebe besitzt. Das bioaktive keramische Verbundmaterial ist in hohem Maße bioresorbierbar und seine Biosorptionsfähigkeit und Reaktivität können eingestellt werden, damit sie den Anforderungen von speziellen Therapien und/oder Implantationsgebieten genügen. Das Material kann in Form von Knochenplatten, Knochenschrauben und weiteren Befestigungsvorrichtungen und medizinischen Vorrichtungen hergestellt werden, die hochgradig bioresorbierbar und/oder ossifizierend sind, wobei Anwendungen im Tiermedizinbereich eingeschlossen sind.

**[0016]** Diese und weitere Merkmale der Erfindung werden durch eine selbsthärtende biokeramische Zusammensetzung erfüllt, die einen hydratisierten Precursor eines Calciumphosphat und eine Flüssigkeit auf Wasserbasis in einer Menge enthält, die ausreichend ist, um das Calciumphosphat unter Bildung einer Paste oder Kittmasse zu hydratisieren, und die dadurch gekennzeichnet ist, dass das Härten des hydratisierten Precursors mit einem endothermen Abbinden verbunden ist.

**[0017]** Alternativ hierzu enthält eine selbsthärtende biokeramische Zusammensetzung einen hydratisierten Precursor eines amorphen Calciumphosphat und eine Flüssigkeit auf Wasserbasis in einer Menge, die ausreichend ist, um das Calciumphosphat unter Bildung einer Paste oder einer Kittmasse zu hydratisieren, wobei sie dadurch gekennzeichnet ist, dass der hydratisierte Precursor in mehr als zehn Minuten härtet.

**[0018]** Nach einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird eine biokeramische Zusammensetzung angegeben, die ein wenigkristallines Calciumphosphat enthält, das hergestellt wird, indem das Härten eines hydratisierten Precursors begünstigt wird, der ein amorphes Calciumphosphat und eine Flüssigkeit auf Wasserbasis in einer Menge enthält, die ausreichend ist, um das amorphe Calciumphosphat unter Bildung einer Paste oder einer Kittmasse zu hydratisieren, wobei das Härten mit einer endothermen Reaktion und der Umwandlung des amorphen Calciumphosphat in das wenigkristalline Calciumphosphat verbunden ist.

**[0019]** Die erfindungsgemäße biokeramische Zusammensetzung kann hergestellt werden, indem (a) ein amorphes Calciumphosphat, (b) ein Promotor, (c) ein ergänzendes Material und (d) eine Flüssigkeit auf Wasserbasis in einer Menge, die ausreichend ist, damit eine Paste oder Kittmasse gebildet wird, in beliebiger Reihenfolge vermischt werden, wobei die Paste oder Kittmasse in ein wenigkristallines apatitisches Calciumphosphat umgewandelt wird und die Umwandlung mit der Härtung der Paste in einer endothermen Reaktion einhergeht.

### DEFINITIONEN

**[0020]** "Amorph" – Unter "amorph" wird, wie dieser Ausdruck hier verwendet wird, ein Material mit signifikant amorphem Charakter verstanden. Unter einem signifikant amorphem Charakter ist mehr als 75% amorpher Ge-

halt und vorzugsweise mehr als 90% amorpher Gehalt zu verstehen; ein signifikant amorpher Charakter ist durch ein breites, merkmalsloses Röntgenbeugungsbild gekennzeichnet. In dem Material kann in geringem Maße Kristallinität vorliegen. Für die amorphen Precursormaterialien gemäß der vorliegenden Erfindung liegt der Kristallinitätsgrad vorzugsweise unter dem für das Produktmaterial gewünschten Kristallinitätsgrad.

**[0021]** "Bioaktiv" – Der Ausdruck "bioaktiv" bezieht sich auf ein Material, das in dem und um das Implantat Hartgewebebildung induziert. Bei Implantation in weiches Gewebe kann für die Bioaktivität auch die Gegenwart eines Wachstumsfaktors oder trophischen Faktors oder das Animpfen des Implantats mit einem Hartgewebe bildenden Zelltyp erforderlich sein.

**[0022]** "Biokompatibel" – Der Ausdruck "biokompatibel" bedeutet, wie er hier verwendet wird, dass das Material bei dem Transplantatempfänger keine erheblich schädigende Antwort auslöst. Wenn ein fremder Gegenstand in einen lebenden Körper eingebracht wird, besteht immer die Gefahr, dass der Gegenstand eine Immunantwort auslöst, beispielsweise eine Entzündung, die auf den Empfänger negative Auswirkungen hat. Obwohl Hydroxyapatit im Allgemeinen als "biokompatibel" angesehen wird, wurden Entzündungen und Gewebenekrosen in erheblichem Umfang beobachtet, wenn kristalline Hydroxyapatit-Mikrocarrier intramuskulär in Tiere eingesetzt wurden (siehe beispielsweise Ijntema et al., Int. J. Pharm 112: 215 (1994)).

**[0023]** "Bioresorbierbar" – "Bioresorbierbar" bezieht sich auf die Fähigkeit eines Materials, in vivo resorbiert zu werden. "Vollständige" Resorption bedeutet, dass keine signifikanten extrazellulären Fragmente übrig bleiben. Der Resorptionsprozess umfasst die Beseitigung des ursprünglichen Implantatmaterials durch die Einwirkung von Körperflüssigkeiten, Enzymen oder Zellen. Resorbiertes Calciumphosphat kann beispielsweise als Knochenmineral wieder abgelagert werden oder in anderer Weise im Körper wiederverwendet oder ausgeschieden werden. "Stark bioresorbierbar" bedeutet, wie der Ausdruck hier verwendet wird, dass wenigstens 80% und vorzugsweise 95–99% und noch bevorzugter > 99% der Gesamtmasse des intramuskulär oder subkutan implantierten Materials innerhalb eines Jahres resorbiert wird. In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist das stark resorbierende wenigkristalline apatitische (PCA, poorly crystalline apatitic) Calciumphosphat dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens 80% des Materials innerhalb eines Jahres resorbiert wird, wenn mindestens 1 g (vorzugsweise 1–5 g) des PCA-Materials subkutan oder intramuskulär implantiert wird. In noch bevorzugteren Ausführungsformen wird das Material innerhalb von neun Monaten, sechs Monaten, drei Monaten und idealerweise einem Monat resorbiert. Besonders bevorzugte Materialien sind ferner dadurch gekennzeichnet, dass sie in den genannten Zeitabschnitten vollständig resorbiert werden können. Im Sinne dieser Offenbarung bedeutet "schwach" resorbierbar, dass weniger als 80% des Ausgangsmaterials nach einem Jahr resorbiert ist.

**[0024]** "Wirksame Menge" – Eine wirksame Menge eines ergänzenden Materials ist eine Menge, die ausreichend ist, um dem Verbund die gewünschte mechanische oder chemische Eigenschaft zu geben.

**[0025]** "Härten" – "Härten" oder "Härtung" bezieht sich auf den Vorgang, bei dem der hydratisierte Precursor in das gehärtete PCA-Material umgewandelt wird. Das PCA-Material wird als "gehärtet" angesehen, wenn es als im Wesentlichen nicht formbarer Feststoff vorliegt. Solch ein gehärtetes PCA-Material hat eine minimale Kompressibilität und neigt dazu, nicht elastisch, sondern plastisch verformt zu werden.

**[0026]** "Hydratisierter Precursor" – Der Ausdruck "hydratisierter Precursor" bezieht sich, wie er hier verwendet wird, auf die Paste oder Kittmasse, die durch Hydratation der trockenen Precursoren in Gegenwart einer beschränkten Menge einer wässrigen Lösung (d. h. weniger als etwa 1 ml wässrige Lösung/1 g Precursor in Pulverform) gebildet wird. Der hydratisierte Precursor kann sowohl Reaktanten als auch Produkte in verschiedenen Kombinationen enthalten, die von dem Ausmaß abhängen, bis zu dem die Umwandlung fortgeschritten ist. Sowohl die hier beschriebenen "injizierbaren" als auch die "formbaren" Precursorpasten sind hydratisierte Precursoren. Bevorzugte "injizierbare" hydratisierte Precursoren haben eine Konsistenz, die geeignet ist, damit sie durch eine Injektionsnadel Nr. 18 abgegeben werden können.

**[0027]** "Wenigkristallines apatitisches Calciumphosphat", "PCA-Calciumphosphat" und "PCA-Material" beschreiben, wie diese Ausdrücke hier verwendet werden, ein synthetisches, wenigkristallines apatitisches Calciumphosphat. Das PCA-Material ist nicht notwendigerweise auf eine einzige Calciumphosphatphase beschränkt, unter der Voraussetzung, dass es das charakteristische XRD- und FTIR-Muster aufweist. Ein PCA-Calciumphosphat hat im Wesentlichen das gleiche Röntgenbeugungsspektrum wie Knochen. Das Spektrum ist im Allgemeinen lediglich durch zwei breite Peaks in der Gegend von 20–35° gekennzeichnet, wobei ein Peak bei 26° und der andere bei 32° zentriert ist. Es ist ferner durch FTIR-Peaks bei 563 cm<sup>-1</sup>, 1034 cm<sup>-1</sup>, 1638 cm<sup>-1</sup> und 3432 cm<sup>-1</sup> (±2 cm<sup>-1</sup>) gekennzeichnet. Es werden bei 603 cm<sup>-1</sup> und 875 cm<sup>-1</sup> zwei scharfe Schul-

tern beobachtet, mit einem Dublett, das Maxima bei  $1422\text{ cm}^{-1}$  und  $1457\text{ cm}^{-1}$  aufweist.

**[0028]** "Promotor" – Der Ausdruck "Promotor" beschreibt, wie er hier verwendet wird, ein Material oder eine Behandlung, die das Härten eines hydratisierten Precursors begünstigt und die Umwandlung von ACP in PCA-Calciumphosphat verbessert. Einige Promotoren nehmen an der Umwandlung teil und werden in das gebildete PCA-Material aufgenommen; andere, als "passive" Promotoren bekannt, nehmen nicht an der Reaktion teil.

**[0029]** "Reaktiv" – "Reaktiv" bezieht sich hier auf die Fähigkeit eines amorphen Calciumphosphat, in Gegenwart eines Promotors unter Härten der Precursormaterialien in ein erfindungsgemäßes PCA-Material umgewandelt zu werden, wenn es zur Bildung eines hydratisierten Precursors mit einer Flüssigkeit vermischt wird. Bevorzugte ACPs sind durch die Fähigkeit, vollständig umgewandelt zu werden, die Fähigkeit, beim Härten schnell umgewandelt zu werden, die Fähigkeit, mit ansonsten inerten Verbindungen umgewandelt zu werden, und/oder die Fähigkeit gekennzeichnet, in ein im Wesentlichen homogenes PCA-Material umgewandelt zu werden. Wenn das ACP mit einem zweiten Calciumphosphat umgesetzt wird, kann die "Umwandlung" die Umwandlung sowohl des ACP als auch des zweiten Calciumphosphat umfassen. Das Ausmaß der Härtung und die Kinetik des Härtungsprozesses sind ebenso wesentliche Elemente der Reaktivität. Einige ACPs sind reaktiver als andere. Ein ACP wird als "hochreaktiv" angesehen, wenn es in Gegenwart eines schwachen Promotors, wie Dicalciumphosphat-Dihydrat ("DCPD") mit einer Korngrößenverteilung, die einen erheblichen Anteil von Körnern mit einer Größe über  $100\text{ }\mu\text{m}$  umfasst, umgewandelt wird, und zu einem PCA-Material aushärtet. Bevorzugte hochreaktive ACPs bilden in Gegenwart eines schwachen DCPD-Promotors und Wasser bei  $37^\circ\text{C}$  in weniger als zwölf Stunden ein gehärtetes PCA-Material, wobei die Härtung nach etwa ein bis fünf Stunden und idealerweise 10–30 Minuten im Wesentlichen vollständig ist.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0030]** Fig. 1 ist eine hochauflösende transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des reaktiven amorphen Calciumphosphat, die die Körner mit einer Größe im Nanometerbereich in Clustern mit relativ unscharfen Grenzen und teilweise eingebettet ohne Form (Pfeile) zeigt;

**[0031]** Fig. 2 ist ein energiedisperses mit der Elektronenstrahlmikrosonde aufgenommenes Spektrum des erfindungsgemäßen reaktiven amorphen Calciumphosphat nach dem Erwärmen im Vakuum, das zu einem Ca/P-Verhältnis von 1,58 geführt hat;

**[0032]** Fig. 3 zeigt die Löslichkeitskurve eines wenigkristallinen apatitischen Calciumphosphat, das aus dem erfindungsgemäßen amorphen Calciumphosphat erhalten wurde, im Vergleich mit kristallinem Hydroxyapatit. Es wird auf die höhere Löslichkeit des erfindungsgemäßen Materials im Vergleich mit einer kristallineren Form von Hydroxyapatit hingewiesen, die über die Menge der bei  $37^\circ\text{C}$  gelösten Calciumionen gemessen wurde;

**[0033]** Fig. 4 zeigt Röntgenbeugungsbilder von (a) reaktivem amorphen Calciumphosphat und (b) Dicalciumdiphosphat, die in einer Umsetzung zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Knochenersatzmaterials verwendet wurden;

**[0034]** Fig. 5a–Fig. 5d sind Röntgenbeugungsbilder, die das Fortschreiten der Reaktion eines Gemisches von reaktivem amorphen Calciumphosphat und Dicalciumdiphosphat zur Bildung eines erfindungsgemäßen PCA-Materials zeigen;

**[0035]** Fig. 6 ist ein Infrarotspektrum von (a) Dicalciumphosphat-Dihydrat, (b) erfindungsgemäß aktiviertem ACP und (c) dem erfindungsgemäßen PCA-Material;

**[0036]** Fig. 7 ist ein Röntgenbeugungsbild von natürlichem Knochengewebe;

**[0037]** Fig. 8 zeigt in einem Säulendiagramm die Partikelgrößenverteilung für verschiedene, in Beispiel 10 beschriebene Formulierungen;

**[0038]** Fig. 9 zeigt mikroskopische Aufnahmen von tibialen Defekten, die entweder unbehandelt sind (Fig. 9a) oder mit einem erfindungsgemäßen Abgabesystem behandelt wurden (Fig. 9b); in Fig. 9a gibt der kleine Pfeil eine Grenze des Defekts an; die große Pfeilspitze befindet sich an dem noch unverbrückten Defekt; in Fig. 9b kennzeichnen große Pfeilspitzen eine Grenze des Defekts; in beiden Figuren (wobei die Vergrößerung  $4\times$  ist) ist der Knochen decalcifiziert, die Präparate wurden mit Hämatoxylin und Eosin behandelt;

**[0039]** Fig. 10 ist eine mikroskopische Aufnahme von caninem trabekulären Knochenwachstum in einen mit dem erfindungsgemäßen PCA-Material behandelten Defekt (Vergrößerung 10 ×; entkalkt; Hämatoxylin und Eosin);

**[0040]** Fig. 11 ist eine mikroskopische Aufnahme eines caninen Kortikalisdefekts, der mit dem erfindungsgemäßen PCA-Material behandelt wurde (Vergrößerung 4 ×; nicht entkalkt; Light Green Basic Fuchsin);

**[0041]** Fig. 12 zeigt mikroskopische Aufnahmen von unbehandelten (Fig. 12a) und behandelten (Fig. 12b) Tibiadefekten beim Kaninchen 4 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff (Vergrößerung 4 ×; entkalkt; Masson Trichrom);

**[0042]** Fig. 13 ist ein Röntgenbeugungsbild von PCA-Calciumphosphat, mit einem passiven  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Promotor hergestellt, wobei die  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Peaks durch Linien dargestellt sind;

**[0043]** Fig. 14 ist ein Röntgenbeugungsbild von PCA-Calciumphosphat, das gemäß Beispiel 1-2 hergestellt wurde;

**[0044]** Fig. 15 ist ein Röntgenbeugungsbild von PCA-Calciumphosphat, das gemäß Beispiel 1-4 hergestellt wurde;

**[0045]** Fig. 16 ist ein DSC-Ausdruck (Differential Scanning Calorimetry) der Reaktion von reaktivem ACP mit DCPD, der die endotherme Art der Reaktion zeigt;

**[0046]** Fig. 17 ist ein Infrarotspektrum des amorphen Calciumphosphatmaterials vor der Wärmebehandlung (Fig. 17a) und nach der Wärmebehandlung (Fig. 17b);

**[0047]** Fig. 18 ist eine XRD-Aufnahme des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat über die gesamte Breite;

**[0048]** Fig. 19 zeigt bildhaft ein erfindungsgemäßes Implantat an der Stelle eines nicht verwachsenen Knochenbruchs;

**[0049]** Fig. 20 zeigt bildhaft ein erfindungsgemäßes Implantat, das an der Stelle eines fragmentierten Knochens eingebracht wird;

**[0050]** Fig. 21 zeigt bildhaft ein Implantat, das mit einer Spritze an die Stelle eines osteoporotischen Knochens eingebracht wird;

**[0051]** Fig. 22 zeigt bildhaft ein Implantat, das mit Hilfe einer Spritze in einen osteoporotischen Wirbel eingebracht wird;

**[0052]** Fig. 23 zeigt bildhaft ein erfindungsgemäßes Implantat, das als Knochenzement zur Befestigung einer Hüftprothese verwendet wird;

**[0053]** Fig. 24 zeigt bildhaft ein erfindungsgemäßes Implantat, das in eine Zahnalveole eingebracht wird;

**[0054]** Fig. 25 zeigt bildhaft ein erfindungsgemäßes Implantat, das in einen Alveolarkamm eingebracht wird;

**[0055]** Fig. 26 ist eine mikroskopische Aufnahme eines caninen Zahnfachdefekts, der mit dem erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat behandelt wurde (Vergrößerung 4 ×; nicht entkalkt; Light Green Basic Fuchsin);

**[0056]** Fig. 27 ist eine Röntgenaufnahme der osteoporotischen Wirbelsäule einer menschlichen Leiche, die das Einbringen der Nadel vor der Injektion des PCA-Calciumphosphat zeigt; und

**[0057]** Fig. 28 ist eine Aufnahme eines individuellen Wirbels einer menschlichen Leiche in Draufsicht vor der Injektion des PCA-Calciumphosphat (Fig. 28a) und nach der Injektion (Fig. 28b).

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0058]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf biokompatible keramische Zusammensetzungen, die für



die Verwendung bei der Wiederherstellung und Wachstumsförderung von Hartgewebe geeignet sind, einschließlich der Herstellung von resorbierbaren orthopädischen und dentalen Vorrichtungen. Die Zusammensetzungen umfassen ein biokompatibles und stark resorbierbares, wenigkristallines, apatitisches Calciumphosphat (PCA-Calciumphosphat) mitunter in Kombination mit einer geeigneten biokompatiblen Matrix oder Additiven. Das PCA-Calciumphosphat kann für dentale Anwendungen, für orthopädische Anwendungen, zur Arzneimittelabgabe, zur Zelltherapie und für weitere therapeutische Anwendungen verwendet werden.

**[0059]** Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann als Knochenzement auf die mit dem Knochengewebe in Kontakt stehenden Oberflächen von Prothesen aufgebracht werden. Sie kann direkt als Füllmaterial auf Knochendefekte aufgebracht werden, wo sie befähigt ist, das Wachstum von neuem Knochengewebe zu fördern. Die Zusammensetzung kann in gleicher Weise für die Wiederherstellung, das Wachstum oder die Bildung von Knorpelgewebe verwendet werden. Alternativ hierzu kann die Zusammensetzung verwendet werden, um Stabilisierungen oder Vorrichtungen wie Schrauben und Platten herzustellen, die unter geeigneten Umständen resorbiert und durch Knochen- oder Knorpelgewebe ersetzt werden. Die Zusammensetzung kann auch freistehend in weichem Gewebe verwendet werden. Wenn ein pharmazeutischer Wirkstoff zu der Zusammensetzung gegeben wird, dient sie als Arzneimittelabgabesystem, wobei die Abgabe des Wirkstoffes über einen ausgedehnten Zeitraum nach der Implantation erfolgen kann, da die Zusammensetzung langsam biologisch abgebaut wird.

**[0060]** Die Erfindung gibt außerdem Verfahren für die kontrollierte Förderung der Umwandlung von ACP in PCA-Calciumphosphat in der Form einer Paste oder einer Kittmasse an, die in vorhersehbarer Weise härtet.

**[0061]** Die erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat-Biokeramiken weisen im Vergleich mit dem idealen stöchiometrischen Wert von etwa 1,67 für Hydroxyapatit im Allgemeinen ein Calciumdefizit mit einem Calcium/Phosphat-Verhältnis von unter 1,5 auf. Sie sind außerdem durch ihre biologische Resorbierbarkeit und die minimale Kristallinität gekennzeichnet. Sie können schnell bioresorbierbar sein und eine hohe Porosität und/oder niedrige Dichte aufweisen oder langsam bioresorbierbar sein und eine niedrigere Porosität und/oder hohe Dichte besitzen. Ihr kristalliner Charakter entspricht im Wesentlichen natürlichem Knochengewebe, ohne den höheren Grad an Kristallinität, der in den im Stand der Technik bekannten Knochenersatzmaterialien vorliegt. Das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat ist auch biokompatibel, d. h., es gibt keine erheblichen schädlichen Reaktionen (beispielsweise Entzündungen oder Fibrosen), die in dem Empfänger durch das implantierte Material ausgelöst werden. Materialien, die Entzündungen oder Fibrosen in einem medizinisch akzeptablen Grad hervorrufen, werden als biokompatibel angesehen. Das PCA-Calciumphosphat kann in der Form eines feuchten Precursors (d. h. hydratisierten Precursors) verwendet und als Zement direkt in einem Operationsgebiet, wie beispielsweise einem Bruch, aufgebracht werden, oder es kann ex vivo gehärtet und anschließend implantiert werden.

**[0062]** Die Resorbierbarkeit des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat rührt von einer Kombination aus Dichte, Porosität, chemischer Zusammensetzung und kristalliner Struktur. Geringe Kristallinität in Apatiten ist im Vergleich mit anderen kristallinen Arten mit einer etwas höheren Löslichkeit in wässrigen Systemen verbunden, und es wird daher angenommen, dass die geringe Kristallinität und/oder die Gegenwart von stabilen amorphen apatitischen Domänen in dem erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat mit seiner Resorbierbarkeit in biologischen Systemen verknüpft ist. Die Porosität erleichtert das Eindringen von Zellen und Zellvorgänge in der biokeramischen Matrix und die Diffusion von Substanzen in das Innere der Matrix und aus der Matrix heraus. PCA-Calciumphosphat-Zusammensetzungen mit niedrigerer Porosität werden daher in vivo langsamer resorbiert als solche mit hoher Porosität. Die Verwendung von Reaktanten mit gesteuerter Partikelgröße führt gemäß einer Ausführungsform zu einem PCA-Calciumphosphatmaterial mit eingestellter Porosität. Es können auch andere Verfahren zur Erhöhung der Porosität eingesetzt werden, beispielsweise chemisches oder physikalisches Ätzen und Extrahieren.

**[0063]** Die erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphate können mit einer Vielzahl von Resorptionsraten im Bereich von langsamen Resorptionsraten größer als ein Jahr (typisch für schwach resorbierende hydroxyapatitische Knochenfüllmaterialien und Knochenersatzmaterialien, die im Stand der Technik bekannt sind) bis zu Resorptionsraten von bis zu einigen Gramm, beispielsweise 1–5 g, in 1 bis 2 Monaten hergestellt werden. In Abhängigkeit von der Dichte, Porosität, verwendeten Reaktanten, Endkristallinität des Reaktionsproduktes und Menge der verwendeten Kristallisationsinhibitoren können daher Formulierungen hergestellt werden, mit denen ein Gramm der Vorrichtung in einer beliebigen gewünschten Zeitspanne – von 2 Wochen bis zu 1, 3 oder 6 Monaten oder 1, 2 oder 3 Jahren – vollständig resorbiert wird. Ein stark resorbierbares PCA-Calciumphosphat der vorliegenden Erfindung weist in vivo eine solche Resorptionsrate auf, dass 80% (vorzugsweise 95–99% und noch bevorzugter > 99%) oder darüber von mindestens ein Gramm (vorzugsweise 1–5 g) des



Ausgangsmaterials innerhalb eines Jahres, vorzugsweise innerhalb von 6 Monaten, noch bevorzugter in weniger als 3 Monaten und besonders bevorzugt innerhalb von 1–2 Monaten resorbiert sind.

**[0064]** Es hat sich herausgestellt, dass für die Bildung von neuem Knochengewebe Präparate, die innerhalb von etwa 6–8 Wochen vollständig resorbiert und durch Knochengewebe ersetzt sind, innerhalb von 12 Wochen zu histologisch normalem Knochengewebe führen.

**[0065]** In manchen Belastungssituationen kann es wünschenswert sein, dass die Resorption langsamer erfolgt. Wenn hartes Gewebe ektopisch hergestellt wird oder die Form eines vorhandenen Hartgewebes vergrößert werden soll, kann es günstig sein, etwas langsamer resorbierendes PCA-Calciumphosphat zu verwenden.

**[0066]** Die Anpassung der Dichte oder Porosität des resultierenden PCA-Calciumphosphat oder die Verwendung von Reaktionsparametern, die die Geschwindigkeit und Härte des Abbindens beeinflussen, sind zweckmäßige Ansätze, um die Resorptionszeit des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat in vivo zu variieren. Diese Parameter können einzeln oder in Kombination angepasst werden, je nachdem, wie spezielle Anwendungen dies erfordern.

**[0067]** Langsame Resorption (mehr als drei Monate) wird begünstigt, wenn ein PCA-Calciumphosphat mit hoher Dichte und niedriger Porosität und/oder schnelle Reaktions- und Härtungszeiten verwendet werden. Schnelle Resorption (drei Monate oder darunter) wird durch ein PCA-Calciumphosphat mit niedriger Dichte und hoher Porosität und/oder langsame Reaktions- und Abbindezeiten begünstigt. Die Anleitung für die Anpassung der Rate und Vollständigkeit der Reaktion für die Bildung des PCA-Calciumphosphat wird hier an einer anderen Stelle angegeben. Im Folgenden wird die Herstellung von bevorzugten PCA-Calciumphosphat-Precursoren beschrieben, die zu gehärteten PCA-Calciumphosphatzementen mit unterschiedlichen Resorptionskinetiken in vivo führen.

**[0068]** Ein schnell resorbierendes PCA-Calciumphosphat wird durch Umwandlung des hochreaktiven ACP von Beispiel 5 unter Verwendung eines DCPD mit einer Korngrößenverteilung, die einen beträchtlichen Anteil an Korngrößen über 100 µm aufweist (beispielsweise entsprechend der Verteilung B1 in Tabelle 3) als Promotor erhalten. Die Pulver werden als hydratisierter Precursor wie in Beispiel 8 beschrieben hergestellt.

**[0069]** Ein langsam resorbierendes PCA-Calciumphosphat wird durch Umwandlung des hochreaktiven ACP von Beispiel 5 unter Verwendung eines DCPD mit einer Korngrößenverteilung, die einen minimalen Anteil an Korngrößen über 100 µm aufweist (beispielsweise entsprechend der Verteilung B1 in Tabelle 3) als Promotor erhalten. Die Pulver werden als hydratisierter Precursor wie in Beispiel 9 beschrieben hergestellt.

**[0070]** Das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat wird ossifiziert. Ossifikation bezieht sich auf den Ersatz des implantierten synthetischen Calciumphosphat durch Knochengewebe, das histologisch natürlichem Knochengewebe ähnlich oder mit natürlichem Knochengewebe identisch ist. Ossifikation des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat tritt eher in Stufen auf, wobei unorganisierteres Knochenmaterial vor dem Auftreten von natürlicher aussehendem Gewebe festgestellt wird. Das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat unterscheidet sich von früheren Knochenfüllmaterialien und Zementen, da die Knochenbildung nicht nur an den äußeren Grenzen des Implantats auftritt, sondern wahrscheinlich zusammen mit dem Resorptionsprozess gleichzeitig überall in dem gesamten Implantat beginnt. Innerhalb von zwei bis drei Wochen nach der Implantation des PCA-Materials ist in einem belasteten Bereich, beispielsweise der Tibia oder dem Radius, die beginnende Ossifikation durch die Bildung von kleinen Bereichen von mineralisiertem osteoidem Gewebe (Spicula) zu sehen. Nach vier Wochen sind die Spicula in spitzenartige dünne trabekuläre Substantia spongiosa und dünne Substantia compacta übergegangen. Nach sechs Wochen ist geordneter, kompakter Rindenknochen, der normal oder dicker als normal ist, mit Lacunae-haltigen Osteozyten zu sehen. Nach sechs Wochen findet der letzte Umbau statt, so dass nach zwölf Wochen das neu ossifizierte Knochengewebe von nativem Knochengewebe nicht zu unterscheiden ist.

**[0071]** In der Gegenwart von PCA-Calciumphosphat ist die Ossifikation also im Allgemeinen vollständig und scheint schneller vorstatten zu gehen als normales Knochenwachstum. Diese schnelle Ossifikationsrate weist darauf hin, dass das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat die Heilung von Knochen fördert. Neues Knochengewebe wird schon nach zwei Wochen beobachtet und kann den histologisch voll organisierten Zustand innerhalb von sechs Wochen, auf jeden Fall jedoch nach 3–6 Monaten erreichen. Unter Verwendung von Implantaten mit bis zu 3 g hydratisiertem Precursor wurden bei Modellen für Segmentale Defekte (Schaf) innerhalb von drei Monaten Knochen mit 100% der Festigkeit von Knochen ohne Fraktur festgestellt. In Gegenwart von Nahrungs- oder Wachstumsfaktoren, wie Knochenmorphogenese-Proteinen, kann dieser Prozess be-

schleunigt werden.

**[0072]** Zur Optimierung der Ossifikation können nach bevorzugten Ausführungsformen die Vorrichtungen, Pasten und Kittmassen gemäß der Erfindung mit knochenbildenden Zellen angeimpft werden. Dies wird am einfachsten dadurch erreicht, dass die Vorrichtung (die das PCA-Calciumphosphat oder einen hydratisierten Precursor enthält) mit einer Quelle von patienteneigenen knochenbildenden Zellen in Kontakt gebracht wird. Solche Zellen können in Knochen-assoziiertem Blut oder Knochen-assoziierten Flüssigkeiten vorhanden sein, einschließlich exogenen Fluiden, die mit Knochengewebe oder Knochenmaterialien oder Bereichen einschließlich Knochenhaut, Substantia compacta, Substantia spongiosa oder Knochenmark in Kontakt gebracht wurden. Sie sind auch in Geweben mit Substantia compacta oder spongiosa, Knochenmark oder Periosteum vorhanden. Im Falle von Vorrichtungen, wie Schrauben und Stiften, bei denen das Einbringen in den Knochen durch Blutungen begleitet ist, ist kein weiteres Animpfen erforderlich. Für Platten, die lediglich dem Rindenknochen gegenüberliegen, ist die Induktion einer periostalen Läsion, die mit der Vorrichtung in Kontakt kommen wird, zu empfehlen. Es kann zweckmäßig sein, durch Entfernen eines Teils des Rindenknochens an der Implantationsstelle chirurgisch im Knochen eine Auflage zu bilden. Es können auch andere Schritte unternommen werden, um die Ossifikation zu verbessern, wie z. B. durch Einbringen von knochenbildenden Zellen, die am Patienten selbst gewonnen wurden, in das Transplantat oder durch Einbringen von trophischen Faktoren oder Wachstumsfaktoren, einschließlich Proteinen, in die Vorrichtung oder auf die Vorrichtung. Auch nicht autologe Knochenzellen werden von der Erfindung umfasst, falls der gewünschte Grad der Knochenregeneration auftritt, bevor der Patient die knochenbildenden Zellen abstößt. Zellen oder Gewebe aus Primärquellen, Zelllinien oder Zellbanken können also bei einigen Ausführungsformen zweckdienlich sein. Ähnliche Erwägungen gelten auch für die Knorpelbildung und die Heilung und das Animpfen des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat mit Chondrozyten und/oder anderen knorpelbildenden Zellen.

**[0073]** Wegen der Art der zur Bildung bevorzugter Formulierungen des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat verwendeten Reaktion ist das Material als Implantatmaterial in einem chirurgischen Ablauf wesentlich einfacher zu verwenden als andere Knochenersatzmaterialien, die im Stand der Technik bekannt sind. Die Reaktion wird genauer außerhalb des Körpers initiiert und schreitet bei Raumtemperatur langsam fort, so dass die Gefahr, dass das Material "aushärtet" und vor dem Einbringen in den Operationsbereich unbrauchbar wird, sehr klein ist. Die Reaktion wird bei Körpertemperatur deutlich schneller und das Material härtet an Ort und Stelle. Sowohl die Konsistenz und Formbarkeit des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat als auch die Reaktionsgeschwindigkeit können außerdem in Abhängigkeit von den therapeutischen Anforderungen variiert werden, indem einige wenige, einfache Parameter abgewandelt werden.

#### Herstellung eines PCA-Calciumphosphat

**[0074]** Viele amorphe Calciumphosphate tendieren dazu, sich im Laufe der Zeit spontan in eine kristallinere Form umzuwandeln. Hydroxyapatit ist eine thermodynamisch günstige Form von Calciumphosphat und stellt oft das Produkt einer solchen Umwandlung dar. Die vorliegende Erfindung hat den Wert der kontrollierten Umwandlung eines ACP in eine kristallinere Form (beispielsweise PCA-Calciumphosphat) ohne deutliche weitere Kristallisierung erkannt, insbesondere, wenn die Umwandlung in Gegenwart einer begrenzten Menge Wasser durchgeführt wird und von einer Härtingsreaktion begleitet ist. Die vorliegende Erfindung gibt Reaktionen an, die zur Bildung von PCA-Calciumphosphat führen. Diese Reaktionen können unter Verwendung eines Precursors mit der Konsistenz einer Paste oder Kittmasse vorteilhaft außerhalb des Körpers initiiert und bei 37°C deutlich beschleunigt werden, wodurch ein gehärtetes Calciumphosphatprodukt gebildet wird. In einigen Ausführungsformen weist das gehärtete PCA-Calciumphosphat eine Durometerhärte und ein Kompressionsmodul ähnlich wie herkömmliche Schulkreide auf. Gelegentlich ist das gehärtete PCA-Material mit der Gegenwart von unumgesetzten Precursoren, Promotoren und/oder ergänzenden Materialien und Nebenprodukten verbunden.

**[0075]** Durch Zusatz von Wasser zu einem Calciumphosphat-Precursor wird gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren ein pastenartiger oder kittmasseartiger hydratisierter Precursor gebildet. Der hydratisierte Precursor wird dann auf etwa 37°C erwärmt, wodurch eine im Wesentlichen insgesamt endotherme Reaktion initiiert wird, die durch die Härtung der Paste oder Kittmasse gekennzeichnet ist, wie dies durch die DSC-Daten (Differential Scanning Calorimeter), wie in [Fig. 16](#) angegeben, gezeigt wird. Das PCA-Calciumphosphatmaterial wird aus dem hydratisierten Precursor durch Umwandlung eines reaktiven amorphen Calciumphosphat in PCA-Calciumphosphat in Gegenwart eines Promotors gebildet. Die Förderung der Umwandlung von ACP in Pastenform zu einem wohlkristallisierten Hydroxyapatit und gleichzeitige Härtung der Paste über eine endotherme Reaktion liegt ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

**[0076]** Ein endotherm härtender Knochenzement hat im Vergleich mit Calciumphosphat-Knochenzementen

und -Füllmaterialien, die im Stand der Technik bekannt sind, einige wesentliche Vorteile. Da die Reaktion keine Wärme entwickelt, besteht nicht die Gefahr der Schädigung von Zellen und Geweben in dem Implantationsgebiet durch Wärme. Außerdem kann wegen der endothermen Natur der Reaktion die Reaktion in kontrollierter Weise fortschreiten, indem die für die Reaktion verfügbare Wärmemenge eingestellt wird. Der hydratisierte Precursor reagiert bei Raumtemperatur und darunter nur minimal. Das bedeutet, dass viele der Probleme bei der Handhabung von chirurgischen Zementen und Füllmaterialien, die im Stand der Technik auftreten, vermieden werden.

**[0077]** In bevorzugten Ausführungsformen werden die Reaktanten außerhalb des Körpers vermischt, wodurch ein hydratisierter PCA-Precursor erhalten wird, der für die Verwendung in einem Operationsgebiet geeignet ist. Die Reaktion wird im Allgemeinen nach Aufbringen an dem Operationsgebiet abgeschlossen, wobei bei manchen Ausführungsformen die Reaktion ex vivo abgeschlossen wird. Die erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat-Reaktionen führen im Allgemeinen zur Härtung des hydratisierten Precursors in weniger als fünf Stunden, im Wesentlichen zu einer Härtung in etwa eins bis fünf Stunden unter physiologischen Bedingungen und vorzugsweise in etwa 10–30 Minuten. Nach einer bevorzugten Ausführungsform wird die Reaktion ausgelöst, indem eine physiologische Salzlösung zu einem Gemisch von zwei trockenen Komponenten gegeben wird, um eine dicke Paste zu bilden, die in einer endothermen Reaktion bei 37°C in etwa einer halben Stunde härtet. Weitere wässrige Agentien, wie beispielsweise Wasser, Pufferlösungen, Seren oder Gewebekulturm Medien, können anstelle von Salzlösungen verwendet werden, sind jedoch nicht darauf beschränkt.

**[0078]** Bei jedem Reaktionsablauf ist es wichtig, dass das ACP vor der Umwandlung einen erheblichen amorphen Charakter bewahrt. Die Gesamtkristallinität in dem als Ausgangsmaterial verwendeten ACP kann genauer nicht größer als die Kristallinität insgesamt sein, die für das Endprodukt gewünscht wird. Einige Reaktionsschemata können daher die Stabilisierung der amorphen Natur des ACP während der Reaktionsdauer erfordern. Beispiele für geeignete Inhibitoren der Kristallbildung, die im Stand der Technik bekannt sind, umfassen Carbonat, Pyrophosphat und Magnesium. Weitere Anleitung für die Verwendung von Kristallisationsinhibitoren gibt Elliot, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier, The Netherlands, 1994.

#### Typen von Promotoren

**[0079]** Der Zweck des Promotors besteht darin, die Härtung des hydratisierten Precursors zu fördern und vorzugsweise die Umwandlung von ACP in ein PCA-Calciumphosphat zu beschleunigen. Jedes Material oder jedes Verfahren, das diesem Zweck dient, wird als im Umfang der Reaktion liegend betrachtet. Dies umfasst auch den begrenzten Fall, bei dem die Härtung ohne Umwandlung auftritt, d. h., wenn ein PCA-Calciumphosphat-Precursor als Ausgangsmaterial verwendet wird.

**[0080]** Im Hinblick auf die Umwandlung von ACP kann ein Promotor die Gesamtreaktion oder jede Teilreaktion fördern, die bei der Umwandlung oder dem Härtungsprozess beteiligt ist. Die hierfür bevorzugten Promotoren vermindern die Aktivierungsenergie für einen oder mehrere spezielle Schritte bei der Umwandlung oder Härtung.

**[0081]** Der zur Umwandlung eines reaktiven ACP in ein erfindungsgemäßes PCA-Calciumphosphat verwendete Promotor kann selbst in ein PCA-Calciumphosphat umgewandelt werden oder in anderer Weise während des Umwandlungsprozesses an einer chemischen oder physikalischen Reaktion teilhaben. Solche Promotoren werden hier als "teilnehmende" Promotoren bezeichnet.

**[0082]** Alternativ hierzu kann ein Promotor während der Umwandlung des reaktiven ACP im Wesentlichen unverändert bleiben und im Wesentlichen dazu dienen, die PCA-Keimbildung und Härtung zu katalysieren oder zu initiieren oder zu verbessern. Diese Promotoren werden als "passive" Promotoren bezeichnet.

**[0083]** Die Förderung der Härtung und Umwandlung eines reaktiven ACP in ein PCA-Calciumphosphat durch die Verwendung weiterer Mittel, wie beispielsweise der Anwendung von Wärme, Druck, reaktiven Gasen, Lösungsmitteln, ionischen Lösungen oder Radiochemie liegt ebenfalls im Umfang der Erfindung. Solche fördernde Mittel werden als die Reaktion verbessernde oder "steigernde" Promotoren bezeichnet.

**[0084]** Im Hinblick auf die Förderung der Bildung eines gehärteten PCA-Calciumphosphat aus ACP können die Promotoren verschiedene Fähigkeiten oder Stärken besitzen. Gleichmaßen sind nicht alle ACP gleich reaktiv. Daher sind schwache Promotoren nicht immer für die Umwandlung von ACPs mit geringer Reaktivität wirksam. Unter solchen Umständen werden stärkere Promotoren bevorzugt. Die Stärke des Promotors kann

in geeigneter Weise getestet werden, indem die Reaktivität eines gegebenen Promotors mit dem bevorzugten Carbonat-haltigen ACP der Erfindung sowohl in seiner wärmeaktivierten hochreaktiven Form als auch in seiner nicht wärmeaktivierten Form nach der in Beispiel 8 beschriebenen Methode verglichen wird. Das Vermischen von Reaktanten mit der Hand ist besonders geeignet, um hochreaktive Promotoren zu identifizieren. Weniger reaktive Promotoren kann das Mischen in einer automatischen Mühle, wie in Beispiel 9 beschrieben, positiv beeinflussen. Durch diese Verfahren konnte in Beispiel 10 gezeigt werden, dass DCPD mit der Korngrößenverteilung B1 ein schwacher Promotor ist, wohingegen Korngrößen im Bereich von  $< 100 \mu\text{m}$  sich als die Reaktion in hohem Maße fördernd erwiesen haben.

**[0085]** Neben der oben angegebenen Anleitung für die Anpassung eines speziellen Promotors an ein gegebenes ACP kann eine solche Anpassung empirisch erfolgen, indem ein gegebenes ACP mit dem gewählten Promotor in der Gegenwart von etwa 1,0 ml Wasser/g Pulver vermischt und das Gemisch in einer feuchten Umgebung auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt wird. Unter diesen Bedingungen führt ein geeigneter Promotor zur PCA-Calciumphosphat-Bildung und zur Härtung der Paste.

**[0086]** Das Herstellungsverfahren des Promotors und/oder des ACP beeinflusst die Leichtigkeit, mit der der hydratisierte Precursor in das PCA-Material umgewandelt wird.

**[0087]** Wie oben erwähnt, beeinflusst das zum Mischen der pulverförmigen Reaktanten vor dem Zusatz der Flüssigkeit durchgeführte Verfahren die Reaktivität des Systems. Das Mischen mit der Hand unter Verwendung von Mörser und Pistill führt nicht zu einem so reaktiven System wie ausgedehntes Vermahlen der pulverförmigen Reaktanten mit einer Maschine. Beim Vergleich von Promotoren ist es daher wichtig, standardisierte Herstellungsbedingungen zu verwenden.

**[0088]** Es wird angenommen, dass die Härtung mit der zugehörigen Umwandlung des ACP in das reaktive PCA-Calciumphosphat ein oberflächenkatalysiertes Phänomen ist. Falls dies so ist, kann es günstig sein, einen speziellen Promotor mit einer reproduzierbaren Oberfläche herzustellen. Spezielle Oberflächen der ACP- und Promotor-Pulver können eingestellt werden, um die Reaktionsbedingungen und die Eigenschaften des PCA-Materials zu kontrollieren. Es ist daher vorteilhaft, einen Promotor mit einer bekannten Korngrößenverteilung bereitzustellen, um die Reproduzierbarkeit der Reaktion zu kontrollieren. Für die Selektion spezieller Korngrößen sind Standard-Siebverfahren geeignet. Es wurde gezeigt, dass spezielle Oberflächen mit der Druckfestigkeit und möglicherweise der Porosität und Resorbierbarkeit des PCA-Materials korreliert sind.

**[0089]** Viele Calcium- oder Phosphat-haltige Verbindungen können bei der Härtungsreaktion als teilnehmende Promotoren verwendet werden. Ein Calciumphosphat-Promotor kann eine beliebige kristalline Struktur aufweisen und sollte so gewählt werden, dass er mit dem ACP entweder direkt oder durch die Verwendung von steigernden Promotoren reagiert. Es werden die teilnehmenden Promotoren bevorzugt, die selbst über eine zwischenzeitlich gebildete PCA-Calciumphosphat-Phase in Hydroxyapatit umgewandelt werden können.

**[0090]** Geeignete teilnehmende Calciumphosphat-Promotoren umfassen neutrale, basische oder saure Calciumphosphate und bevorzugt apatitische Phosphate, die die geeignete Stöchiometrie für die Reaktion liefern, damit ein apatitisches Calciumphosphat erhalten wird. Geeignete Calciumphosphat-Promotoren umfassen (sind jedoch natürlich nicht darauf beschränkt) Calciummetaphosphat, Dicalciumphosphat-Dihydrat, Monetit, Heptacalciumphosphat, Tricalciumphosphate, Calciumpyrophosphat-Dihydrat, Hydroxyapatit, wenigkristallines apatitisches Calciumphosphat, Tetracalciumphosphat, Calciumpyrophosphat, Octacalciumphosphat und ein zweites ACP. Andere Quellen für Phosphat oder Calcium, wie beispielsweise  $\text{CaO}$ ,  $\text{CaCO}_3$ , Calciumacetat und  $\text{H}_3\text{PO}_4$  können zur Bildung eines Endproduktes so vermischt werden, dass ein gewünschtes Ca/P-Verhältnis ähnlich natürlichem Knochen erhalten wird. Es kann günstig sein, eine zweite Komponente im amorphen oder wenigkristallinen Zustand bereitzustellen.

**[0091]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird DCPD als teilnehmender Promotor mit einer Korngröße unter  $200 \mu\text{m}$ , in noch bevorzugteren Ausführungsformen mit einer mittleren Korngröße  $< 95 \mu\text{m}$  und in den bevorzugtesten Ausführungsformen mit einer mittleren Korngröße von etwa  $35\text{--}45 \mu\text{m}$  und einem Maximum der Korngröße von weniger als etwa  $110 \mu\text{m}$  verwendet.

**[0092]** Wenn amorphes Calciumphosphat als einziger Precursor zur Bildung des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat verwendet wird, ist es wichtig, die natürliche Tendenz des ACP zur Umwandlung in hochkristallines Hydroxyapatit zu kontrollieren. Auf der anderen Seite sollte die Umwandlungsrate und die Härtungsrate für eine chirurgische Brauchbarkeit schnell genug sein. Ein Ansatz besteht darin, einen ACP-Precursor, der einen Kristallisationsinhibitor enthält (beispielsweise das ACP von Beispiel 5), mit einem ACP zu kom-

binieren, das keinen Kristallisationsinhibitor enthält (beispielsweise einen Promotor). Die Reaktanten können im trockenen Zustand in der geeigneten Partikelgröße mit einem Überschuss des Inhibitor-haltigen ACP vermischt werden. Die Reaktanten können dann Bedingungen ausgesetzt werden, bei denen Kristalle gebildet werden, beispielsweise kann Wasser zugefügt und anschließend die Temperatur erhöht werden, so dass nach Einbringen in den Körper die Reaktanten in das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat umgewandelt werden. Wenn keine Schritte unternommen werden, diese Umsetzung weiter zu fördern, führt die Verwendung des ACP als Promotor alleine zu einem PCA-Calciumphosphat, das nicht außergewöhnlich gut härtet.

**[0093]** Es ist ein interessantes und unerwartetes Merkmal der erfindungsgemäßen Reaktion, dass zusammen mit dem ACP ein teilnehmender Promotor ebenso in PCA-Calciumphosphat umgewandelt werden kann. Dies wurde experimentell sowohl für DCPD als auch stöchiometrischen Hydroxyapatit gezeigt. Die Umwandlung eines kristallinen Calciumphosphat in einen wenigkristallinen Zustand in einer im Wesentlichen endothermen Reaktion wurde somit erstmals gezeigt.

**[0094]** Weiter oben wurde die Umwandlung von ACP in PCA-Calciumphosphat gezeigt, es hat sich jedoch herausgestellt, dass auch alternative Materialien in ein PCA-Calciumphosphat umgewandelt werden können. Die Bildung einer hydratisierten Precursorpaste aus einem kristallinen Calciumphosphat (einschließlich PCA-Calciumphosphat) in der Gegenwart einer begrenzten Wassermenge in einer insgesamt endothermen Reaktion bei 37°C und Härtung der Paste wird daher als von der Erfindung umfasst angesehen. Eine bevorzugte Ausführungsform dieses Ansatzes zeichnet sich durch ein PCA-Calciumphosphat und ein DCPD als Reaktanten zur Bildung einer PCA-Calciumphosphat-Biokeramik aus.

**[0095]** Hydroxyapatit ist eine thermodynamisch günstige Form von Calciumphosphat. Es liegt daher auch im Rahmen der Erfindung, die Umwandlung des reaktiven ACP in ein PCA-Calciumphosphat in Kombination mit der Härtung eines hydratisierten Precursors unter Verwendung von Promotoren zu fördern, die selbst nicht in PCA-Calciumphosphat (oder Hydroxyapatit) umgewandelt werden. Solche Promotoren werden als "passive" Promotoren bezeichnet und umfassen Substanzen, die Keimbildung verursachen, und Katalysatoren, sind jedoch nicht darauf beschränkt. In dieser Hinsicht besonders geeignet sind Substanzen, die reaktive Oberflächen bereitstellen, welche apatitische Kristallisation zur Bildung eines wenigkristallinen apatitischen Calciumphosphat schwach fördern.

**[0096]** Nach einem Aspekt zeichnet sich die Erfindung durch die Verwendung von passiven Promotoren aus, die eine begrenzte Löslichkeit in der wässrigen Flüssigkeit, welche zur Hydratisierung des ACP verwendet wird, besitzen oder darin unlöslich sind. Geeignete Promotoren umfassen Metalle, Metalloxide, Keramiken, Silicate, Zucker, Salze oder Polymerpartikel, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Für viele Anwendungen bevorzugte Promotoren sind selbst biologisch abbaubar. Im Allgemeinen werden diese Substanzen in Form von Granulat mit einer Korngröße im Bereich von 1 bis 500 µm, vorzugsweise 1 bis 300 µm und noch bevorzugter 1 bis 200 µm bereitgestellt. Die tatsächliche Korngröße kann variiert werden, um die Eigenschaften der partikel-förmigen Substanz zur Förderung der Reaktion zu verbessern.

**[0097]** In der Tabelle 2 des Beispiels 3 ist die Wirkung einer Vielzahl von passiven Promotoren auf die Umwandlung von ACP in PCA-Calciumphosphat in der Gegenwart eines begrenzten Wasservolumens angegeben. Im Allgemeinen liegt der Promotor in einer Menge vor, die der ACP-Menge entspricht, oder in einer kleineren Menge und genauer in einer Menge im Bereich von etwa 1 : 1 bis etwa 5 : 1 ACP : Promotor. Zur Herstellung der Paste wird eine Wassermenge (hier entspricht das Gewicht dem Volumen, da die Dichte von Wasser 1 ist) verwendet, die etwa dem Gesamtgewicht der beiden trockenen Komponenten entspricht. Tatsächliche Verhältnisse von ACP, Promotor und Wasser können in geeigneter Weise bestimmt werden, indem die Komponenten in unterschiedlichen Mengen vermischt werden und die Formulierung gewählt wird, die bei 37°C in der gewünschten Zeit zu einem gehärteten PCA-Calciumphosphat führt. Bevorzugte passive Promotoren umfassen die Granulatformen von SiO<sub>2</sub>, Glimmer, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Poly(L-lactid) (PLLA), Polyglykolid (PGA) und Poly(lactid-co-glykolid) (PLGA)-Copolymere.

**[0098]** Geeignete steigernde Promotoren umfassen schließlich Wasser, Wärme, Salze und zusätzliche Calciumphosphatquellen, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Im Allgemeinen wirken diese Substanzen so, dass die Reaktivität des ACP mit einer zweiten Calcium(phosphat)quelle verbessert und so die Umwandlung von ACP in PCA-Calciumphosphat gefördert wird. Umwandlungsreaktionen können Säure/Base-Reaktionen, Verschiebungsreaktionen, Substitutionsreaktionen und Hydrolysereaktionen umfassen.

**[0099]** Die erfindungsgemäße Reaktion ermöglicht es, die chemische Zusammensetzung des resultierenden Produktes zu gestalten und zu modifizieren, wodurch eine weitere Art und Weise für die Kontrolle der Bioakti-

vität des Endprodukts zur Verfügung steht. Da das amorphe Calciumphosphat üblicherweise vollständig mit den anderen Feststoffen reagiert, wird das Ca/P-Verhältnis des resultierenden Feststoffs durch die als Ausgangsmaterialien verwendeten Gesamtmengen an Calcium und Phosphaten bestimmt. Dies ermöglicht die zuverlässige Herstellung von PCA-Calciumphosphatprodukten einfach durch Auswahl der relativen Mengenteile der als Anfangsmaterialien verwendeten amorphen und sekundären Calciumphosphate. Es ist im Allgemeinen günstig, ein Calcium : Phosphat-Verhältnis von etwa 1,1–1,9, vorzugsweise weniger als 1,5 und noch bevorzugter von etwa 1,4 zu verwenden.

**[0100]** Ein besonders günstiger Ansatz besteht darin, die Precursorpaste annähernd in die richtige Form oder Größe zu bringen und dann das Material *in vitro* in einer feuchten Umgebung bei 37°C zu härten. Das gehärtete Material kann gewünschtenfalls dann präzise gefräst oder bearbeitet werden, um vor der Verwendung am Operationsort die gewünschte Form zu erhalten. Wenn die Aufbewahrung des gehärteten Materials gewünscht wird, kann es zweckmäßig sein, die Stabilität des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat zu erhöhen. In solchen Fällen kann es zweckmäßig sein, die vorgeformten Gegenstände Inhibitoren der Hydroxyapatit-Kristallisation auszusetzen. Die Inhibitoren können in das wässrige Medium gegeben werden, das verwendet wird, um das erfindungsgemäße Calciumphosphat herzustellen. Alternativ hierzu können das fertige Material oder die daraus hergestellten Gegenstände einer inhibierenden Substanz ausgesetzt werden. Geeignete Inhibitoren umfassen Magnesium, Carbonat, Pyrocarbonat, Poly-L-glutamat, Polyacrylat, Phosvitin, Casein und Proteinpolysaccharide, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Eine Anleitung für die Verwendung solcher Verbindungen ist in Termine et al., Arch. Biochem. Biophys. 140: 318–325 (1970) angegeben. Die Aufbewahrung bei 4°C oder vorzugsweise tieferen Temperaturen, wie –20°C oder –75°C, verzögert ebenfalls die Kristallisation.

**[0101]** In den oben beschriebenen Ausführungsformen wird die Paste oder Kittmasse bei 37°C gehärtet. Das Härten bei 37°C ist für *in vivo* Anwendungen des hydratisierten Precursors wichtig; die Reaktion läuft jedoch sowohl bei höheren als auch tieferen Temperaturen ab. Dieser Reaktivitätsbereich kann genutzt werden, wenn die Paste oder Kittmasse außerhalb des Körpers gehärtet werden soll. In solchen Fällen können höhere Temperaturen angewendet werden, um den Härtungsvorgang noch zu beschleunigen. Hierfür werden Temperaturen unter etwa 48°C bevorzugt.

**[0102]** Für die *in vitro* Härtung ist die Verwendung einer feuchten Umgebung zweckmäßig (wenn auch nicht kritisch), da die Reaktion üblicherweise Wasser verbraucht. Außerdem ist es günstig, den Wasserverlust der Probe während des Härtens durch Verdampfen des Wassers zu vermeiden. Daher wird bevorzugt eine Reaktionskammer mit einer hohen Umgebungsfeuchtigkeit (> 80%, vorzugsweise 100% Feuchte) bevorzugt. Alternativ können die Reaktion und die Härtung auch unter Wasser durchgeführt werden.

**[0103]** Die erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat-Materialien und Verbundmaterialien sind porös. Luftgetrocknete Proben können im Allgemeinen Wasser bis zu einer Menge von 20% ihres Gesamtvolumens oder darüber absorbieren. In vielen Ausführungsformen kann Wasser in Mengen über 30% des gesamten Probenvolumens und in einigen bevorzugten Ausführungsformen in Mengen über 40% und vorzugsweise über 50% des Probenvolumens absorbiert werden.

**[0104]** Es sind alle Vorgehensweisen zur Veränderung der Porosität des gehärteten Materials denkbar; bevorzugte Ansätze umfassen die Durchführung von kontrolliertem Pressformen bei der *ex vivo* Herstellung und die Verwendung von speziellen Promotorkorngrößen für die *ex vivo* oder die *in vivo* Härtung. Die Reaktion kann in einer Kammer oder Form bei jedem Druck bis zu mindestens fünf Tonnen durchgeführt werden.

**[0105]** Für die Festlegung neuer Formulierungen des erfindungsgemäßen Materials ist es zweckmäßig, die Art und das Ausmaß der Reaktion zu kennen. Es können verschiedene Tests für die Identifizierung der Reaktionsprodukte und der Vollständigkeit der Reaktion verwendet werden. Die Härte kann durch einfache Inspektion oder manuelle Untersuchung des Reaktionsprodukts bestimmt werden. Die Verwendung von quantitativen Messmethoden unter Verwendung von Kraftmessdosen und Kraftaufnehmern wird jedoch bevorzugt. Die Härte alleine bestätigt nicht notwendigerweise die Umwandlung, die erfindungsgemäßen Reaktionen wurden jedoch so ausgelegt, dass die Härtung mit der Umwandlung stattfindet.

**[0106]** Das Röntgenspektrum des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat ist in **Fig. 18** gezeigt. Wie aus der Figur ersichtlich ist, ist das Spektrum durch breite Peaks bei etwa  $2\theta = 26$  und  $32$  gekennzeichnet. Eine zusätzliche breite Schulter erscheint bei etwa  $2\theta = 29$  und eine weitere könnte bei etwa  $2\theta = 33,6$  vorhanden sein. Weitere scharfe Peaks oder scharfe Schultern, die für kristallinere Apatite charakteristisch sind und in der Gegend von  $2\theta = 27$ – $34$  auftreten, liegen in dem Spektrum nicht vor. Insbesondere gibt es keine scharfen



Peaks oder Schultern, die den Millerschen Indizes 210, 112 oder 300 von Hydroxyapatit entsprechen.

**[0107]** Das FTIR-Spektrum ist durch die Peaks bei  $563\text{ cm}^{-1}$ ,  $1034\text{ cm}^{-1}$ ,  $1638\text{ cm}^{-1}$  und  $3432\text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 2\text{ cm}^{-1}$ ) gekennzeichnet. Es sind scharfe Schultern bei  $603\text{ cm}^{-1}$  und  $875\text{ cm}^{-1}$  zu sehen, mit einem Dublett mit Maxima bei  $1422\text{ cm}^{-1}$  und  $1457\text{ cm}^{-1}$  (siehe [Fig. 6c](#)).

**[0108]** Für einige Ausführungsformen könnte es günstig sein, wenn nach der Umwandlung etwas unumgesetztes kristallines Calciumphosphat vorliegt (beispielsweise DCPD oder Hydroxyapatit). In solchen Fällen können die Mengenanteile des zweiten Calciumphosphat relativ zur Menge des vorliegenden ACP eingestellt werden. Auch Reaktionen unter Verwendung eines schwachen Promotors oder weniger reaktiven ACP können zu unumgesetzten Ausgangsmaterialien in kleinen Mengen führen. Gemische von PCA-Calciumphosphat und DCPD, PCA-Calciumphosphat und Hydroxyapatit oder PCA-Calciumphosphat und weiteren Reaktanten werden von der Erfindung mitumfasst. In einigen wenigen Fällen ist auch die Verwendung von PCA-Calciumphosphat selbst (vorausgesetzt, es hat einen deutlichen amorphen Charakter) anstelle von ACP möglich.

**[0109]** Ein implantierfähiges biokeramisches Material in Precursorform kann als Paste oder Kittmasse hergestellt werden, indem zu den Precursormaterialien ein Fluid gegeben und vermischt wird. Die Precursormaterialien können ein ACP, einen Promotor und zusätzlich ergänzende Materialien umfassen, falls dies erforderlich ist (in manchen Fällen können einige oder alle Bestandteile teilweise vorhydratisiert werden). Das Vermischen der Komponenten kann in jeder geeigneten Reihenfolge erfolgen. Die Komponenten können vermischt und/oder physikalisch zerkleinert werden, bevor das Fluid zugegeben wird. Alternativ hierzu kann das Fluid zu einer einzigen trockenen Komponente gegeben werden, und es können dann zusätzliche trockene Komponenten eingearbeitet werden, um die Paste zu komplettieren.

**[0110]** Die Reaktanten können in einer Vielzahl von Mengenanteilen verwendet werden; in den meisten Fällen hängen die absoluten Verhältnisse der Bestandteile von den Umständen der beabsichtigten Verwendung ab. Für Systeme, in denen nur ein ACP und ein teilnehmender Promotor verwendet werden, werden die Reaktanten im Allgemeinen in gleichen Gewichtsmengen verwendet. Auch das Wasser wird in einer Menge eingearbeitet, die dem Gesamtgewicht der anderen trockenen Reaktanten in etwa entspricht.

**[0111]** Nach einer bevorzugten Ausführungsform werden ein DCPD mit einer Korngrößenverteilung ähnlich der Verteilung B3 aus Beispiel 10 und ein hochreaktives Carbonat-haltiges ACP gemäß Beispiel 5 in einem ACP : DCPD-Verhältnis von 0,5 g : 0,5 g mit Wasser in Mengen von 0,7 bis 1,3 ml kombiniert.

**[0112]** Im Falle von Reaktionen unter Verwendung von passiven Promotoren und ACP alleine hat sich herausgestellt, dass Mengenanteile ACP : Promotor im Bereich von etwa 5 : 1 bis 1 : 1 gut funktionieren. Für ein Gesamtgewicht der Reaktanten von 1 g können 0,5 bis 1,5 ml Wasser verwendet werden.

**[0113]** Geeignete Mengen der Reaktanten und von Wasser können empirisch bestimmt werden, indem (a) die Verhältnisse der trockenen Komponenten und von Wasser, die zur Bildung einer verarbeitungsfähigen Paste oder Kittmasse führen, ermittelt werden; (b) solche Formulierungen gewählt werden, die in einer geeigneten Zeit bei  $37^{\circ}\text{C}$  härten (meistens 20 bis 60 Minuten), und/oder (c) die Eigenschaften der gewählten Formulierungen in einem geeigneten Modellsystem getestet werden (beispielsweise subkutane in vivo Resorption oder in vitro Gewebekultur-Resorptionsmodelle).

**[0114]** In einigen bevorzugten Ausführungsformen (beispielsweise Beispiele 8–10) erfolgt die Reaktion bei Raumtemperatur langsam und ist unter  $18$  bis  $19^{\circ}\text{C}$  fast nicht nachzuweisen (siehe beispielsweise DSC). Die Reaktion wird bei hohen Temperaturen und insbesondere Körpertemperatur beschleunigt. Diese Eigenschaft ist für chirurgische Eingriffe besonders nützlich, da die hydratisierte Precursorpaste, die gebildet wird, indem die Reaktanten mit einem begrenzten Wasservolumen vermischt werden, für eine beträchtliche Zeitspanne (bis zu sieben Stunden) injizierbar und/oder formbar bleibt, wenn sie bei Raumtemperatur aufbewahrt wird, unter der Voraussetzung, dass darauf geachtet wird, dass keine Feuchtigkeit durch Verdampfen verloren geht. Die Paste härtet daher bei Raumtemperatur an Luft (ca.  $22^{\circ}\text{C}$ ) nach einer Zeitspanne über einer Stunde und bleibt länger als 10 Minuten und vorzugsweise länger als eine Stunde und noch bevorzugter länger als drei Stunden formbar und/oder injizierbar. Nach der Injektion an dem Implantator (ca.  $37^{\circ}\text{C}$ ) härtet die Paste in weniger als einer Stunde und vorzugsweise etwa 10–30 Minuten. Wenn die Paste bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wird, wird sie selbst nach einigen Tagen nicht hart, vorausgesetzt, dass darauf geachtet wird, dass durch Verdampfen keine Feuchtigkeit verloren geht. Nach der Implantation kann das Material gehärtet werden, indem das Implantat erwärmt wird. Die Wärme kann durch die Verwendung von Lasern, Ultraschall und dergleichen oder anderen Mitteln, einschließlich der Verwendung von Pharmazeutika zur lokalen Erhöhung oder Erniedrigung der



Körpertemperatur angewandt werden.

**[0115]** In Abhängigkeit von der zugegebenen Flüssigkeitsmenge ergibt das Gemisch aus ACP und Promotor ein hydratisiertes Precursorgemisch mit veränderlicher Konsistenz. Indem die geeignete Flüssigkeitsmenge, die zu den Reaktanten gegeben werden soll, gewählt wird, kann die Viskosität der Precursorpaste bedarfsgemäß angepasst werden. Die Paste kann entweder mit einer injizierbaren oder formbaren Konsistenz oder mit gerade genug Flüssigkeit hergestellt werden, so dass sie sowohl injizierbar als auch formbar ist.

**[0116]** Eine injizierbare Paste wird im Allgemeinen hergestellt, indem die Reaktanten mit einer Menge an Wasser oder Puffer vermischt werden, die ausreichend ist, damit die für die Injektion gewünschte Konsistenz erhalten wird. Meistens wird sie so dick wie möglich sein, wobei es gleichzeitig noch möglich sein sollte, sie durch eine Injektionsnadel Nr. 16-18 abzugeben. Für einige Formulierungen, die die direkte Injektion in festes Gewebe erfordern (beispielsweise in den Rinderknochen eines Osteoporosepatienten), können dünnere Konsistenzen (beispielsweise 1,5 ml H<sub>2</sub>O/g trockene Precursoren) zweckmäßig sein. Wegen der niedrigen Kristallinität der festen Komponenten in der Paste hat das Material deutlich bessere Fließeigenschaften als die Zusammensetzungen des Standes der Technik. Die Fließeigenschaften der resultierenden Paste sind ähnlich wie Zahnpasta, wohingegen die Materialien des Standes der Technik eine granulare oder hafermehlartige Konsistenz aufweisen. Die Paste kann bis zu einige Stunden vor der Verwendung hergestellt werden, wenn sie bei Raumtemperatur aufbewahrt und der Wasserverlust minimal gehalten wird. Selbst wenn Schritte unternommen werden, die Verdampfung minimal zu halten, geht das Halten bei Raumtemperatur gelegentlich mit dem Austrocknen der hydratisierten Materialien einher. In solchen Fällen kann Wasser in geringen Mengen zugefügt und untergemischt werden, um die gewünschte Konsistenz wiederherzustellen. Die Aufbewahrungszeit kann ausgedehnt werden, wenn die Paste bei verminderten Temperaturen im Bereich von 1–10°C im Kühlschrank aufbewahrt wird, vorausgesetzt, dass Schritte unternommen werden, um den Wasserverlust durch Verdampfen minimal zu halten.

**[0117]** In einer anderen bevorzugten Ausführungsform kann eine formbare Paste oder Kittmasse hergestellt werden, die dann an dem Implantationsort eingebracht wird. Der formbare Precursor wird im Allgemeinen hergestellt, indem die trockenen Reaktanten mit Wasser oder Puffer in dem Mengenanteil vermischt werden, der ausreichend ist, damit die für die Bildung gewünschte Konsistenz eingestellt wird. Meistens ist diese Form so dick wie möglich, jedoch noch per Hand formbar, wobei jedoch dünnere, fließfähigere Konsistenzen für einige Anwendungen wünschenswert sind. In vielen Ausführungsformen ist die bevorzugte Konsistenz ähnlich der Konsistenz von Lehm oder Glaserkitt. Das hydratisierte Material kann bis zu einige Stunden vor der Verwendung hergestellt werden, wenn es bei Raumtemperatur oder darunter aufbewahrt und der Wasserverlust durch Verdampfen minimiert wird. Die Aufbewahrungszeit kann verlängert werden, indem das hydratisierte Material bei verminderten Temperaturen im Bereich von 1–10°C im Kühlschrank aufbewahrt wird, unter der Voraussetzung, dass Schritte unternommen werden, um den Wasserverlust durch Verdampfen so gering wie möglich zu halten.

**[0118]** Die Applikation an dem Implantationsort erfolgt in Abhängigkeit von der Art der speziellen Indikation und den Präferenzen des Chirurgen. Ähnliche Erwägungen wie für Knochen gelten für Knorpelimplantate. Injektionstechniken werden durchgeführt, um die erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat-Precursoren direkt in hartes Gewebe (beispielsweise bei Osteoporosepatienten) oder in kleine Brüche einzubringen. Bei größeren Frakturen werden kittmasseartige Konsistenzen bevorzugt und die Implantation erfolgt per Hand oder mit einem Spatel oder dergleichen. Bei der Rekonstruktion werden meistens kittmasseartigen Formen verwendet, es ist jedoch manchmal vorteilhafter, das Material ex vivo vorzuformen, zu härten und zu formen und eine gehärtete Form zu implantieren. Aussetzen oder Mischen des Materials mit Blut oder Körperflüssigkeiten ist möglich und in vielen Fällen als Verfahren zur Förderung von Osteo- oder Chondrogenese bevorzugt.

**[0119]** Die Implantation in weiche Gewebe kann nach einem der oben angegebenen Ansätze erfolgen.

#### Bildung des reaktiven amorphen Calciumphosphat

**[0120]** In bevorzugten Ausführungsformen wird ein ACP in Gegenwart eines Promotors und von Wasser in ein PCA-Calciumphosphat umgewandelt. Die Verwendung eines amorphen Calciumphosphat, das ohne signifikante weitere Kristallisation schnell und vollständig zu einem PCA-Calciumphosphat-Produkt reagieren kann, stellt für eine Vielzahl von medizinischen Verwendungen einen neuen Weg zu einem stark resorbierbaren Calciumphosphat dar. Die Promotoren der vorliegenden Erfindung fördern die Umwandlung und Härtung, indem sie direkt als Reaktanten zusammen mit dem ACP an der Reaktion teilnehmen oder indem sie passiv als Katalysatoren, Keimbildner oder reaktionsfördernde Stoffe dienen, oder in einer Kombination dieser Art.

**[0121]** Nicht alle ACPs besitzen zusammen mit einem gegebenen Promotor die gleiche Reaktivität, und ihre Reaktivität wird im Allgemeinen mit der Reaktivität eines DCPD mit einer Korngrößenverteilung ähnlich der Verteilung B1 in Tabelle 3 verglichen. In den Beispielen 10 und 11 wird eine Vielzahl von ACPs beschrieben, die auf ihre Reaktivität mit einem solchen DCPD getestet wurden. Die Verwendung eines stärkeren DCPD-Promotors mit einer kleineren Korngröße erleichtert die Umsetzung mit schwach reaktiven oder in anderer Weise unreaktiven ACPs. Im Allgemeinen erfordern weniger reaktive ACPs die Verwendung von stärkeren Promotoren und in einigen Fällen Kombinationen von Promotoren.

**[0122]** Nach einer bevorzugten Ausführungsform wird ein hochreaktives ACP verwendet. Hydratisierte Precursoren, die dieses ACP enthalten, sind zur Härtung und Umwandlung entweder in Gegenwart eines starken Promotors, wie DCPD mit kleiner Korngröße (beispielsweise  $< 63 \mu\text{m}$ ), oder in der Gegenwart eines relativ schwachen Promotors befähigt, wie einer DCPD-Probe mit einer deutlichen Menge an Körnern größer  $100 \mu\text{m}$  (beispielsweise Verteilung B1). Ein hochreaktives ACP ist ein Carbonat-haltiges ACP, das durch Wärmebehandlung während etwa einer Stunde bei  $460^\circ\text{C}$  aktiviert wurde.

**[0123]** Die Erfindung gibt außerdem einen Test an, um geeignete reaktive Precursoren für das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat zu identifizieren. Der Test umfasst, ein amorphes Calciumphosphat, DCPD und Wasser zusammenzugeben, einen hydratisierten PCA-Calciumphosphat-Precursor zu bilden und seine Fähigkeit zu ermitteln, in etwa 10 bis 60 Minuten bei Körpertemperatur oder bei etwa Körpertemperatur zu härten. Reaktanten, die in diesem Test zu einem gehärteten PCA-Calciumphosphat geführt haben, können dann intramuskulär in ein Versuchstier eingebracht und auf ihre biologische Resorbierbarkeit getestet werden. Einhundert Milligramm (100 mg) und vorzugsweise dreihundert Milligramm (300 mg) des auf diese Weise hergestellten PCA-Calciumphosphat werden in weniger als 12 Monaten, vorzugsweise weniger als 6 Monaten und noch bevorzugter weniger als 2 Monaten in einem Rattenmuskel resorbiert. Außerdem werden 80% von 1 g Substanz, intramuskulär verabreicht, in der gleichen Zeitspanne resorbiert. Alternativ werden bei der Ratte mindestens 2 g Substanz, subkutan verabreicht, in weniger als 12 Monaten, vorzugsweise weniger als 6 Monaten und noch bevorzugter weniger als 2 Monaten resorbiert. Für die Identifizierung von weniger reaktiven ACP-Formen wird vorzugsweise ein schwacher DCPD-Promotor verwendet. Es können ähnliche Test unter Verwendung anderer teilnehmender oder passiver Promotoren festgelegt werden.

**[0124]** Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht es, anfänglich amorphe Calciumphosphatpartikel von weniger als  $1000 \text{ \AA}$ , vorzugsweise  $200\text{--}500 \text{ \AA}$  und noch bevorzugter  $300 \text{ \AA}$  zu bilden, wobei das weitere Wachstum der Partikel durch schnelle Fällung des Produkts aus der Lösung eingeschränkt wird. In **Fig. 1** ist eine hochauflösende transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme gezeigt, die die morphologischen Eigenschaften und die Art des bevorzugten reaktiven amorphen Calciumphosphat gemäß der Erfindung im Angstrom-Bereich zeigt. Es wird auf die unklaren Grenzen hingewiesen, die im Gegensatz zu kristallinem Material die kugelförmigen Cluster trennen und denen klare Kanten und Oberflächen fehlen.

**[0125]** Während der Reaktion von Calcium- und Phosphationenquellen zur Bildung eines amorphen Calciumphosphat kann ein drittes Ion in die Lösung eingebracht werden; diese Ionen werden in die Struktur des amorphen Niederschlages anstelle der dreiwertigen  $\text{PO}_4^{3-}$ -Gruppe(n) eingebaut. Da einige  $\text{PO}_4^{3-}$  durch das dritte Ion ersetzt werden, nimmt die Anzahl der  $\text{PO}_4^{3-}$  insgesamt ab, so dass das Ca/P-Verhältnis des amorphen Niederschlages (im Vergleich mit Standard-amorphem Calciumphosphat) sinkt und die Valenz oder der Ladungszustand des Calciumphosphat verändert wird. Die amorphen Feststoffe können dann schnell gefriergetrocknet werden, um die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Materials zu erhalten. Die amorphen Feststoffe können dann unter speziell gewählten Bedingungen behandelt werden, um zumindest einige dritte Ionen zu entfernen. Im Falle von Carbonat führen spezielle Temperatur- und Druckbedingungen zur Reduktion des Gesamtkohlenstoffs wahrscheinlich als gasförmiges Kohlendioxid aus dem amorphen Feststoff, wobei die Amorphizität erhalten bleibt.

**[0126]** Die Ursache für die verbesserte Reaktivität ist nicht vollständig verstanden; es wird jedoch angenommen, dass sie mit dem Grad der Amorphizität (fehlende Kristallinität) und in einigen Ausführungsformen Leerstellen in dem Material zusammenhängt, die durch das erfindungsgemäße Verfahren gebildet werden. Leerstellen, wie sie hier angenommen werden, beziehen sich auf das Fehlen eines Gegenstücks in einem Ionenpaar (beispielsweise  $\text{CO}_3^{2-}$ ), fehlend in  $\text{CaCO}_3$ , in einem Material, das viele Ionenpaare enthält. Die Gegenwart von Leerstellen könnte reaktive Stellen für nachfolgende Reaktionen liefern. Das stöchiometrische Ungleichgewicht könnte für die gesteigerte Reaktivität des amorphen Calciumphosphat verantwortlich sein.

**[0127]** Das reaktive ACP ist ein im Wesentlichen amorpher Feststoff mit einem höheren Ca/P-Verhältnis als es typischerweise in amorphen Calciumphosphaten vorliegt, wobei es in der Vergangenheit im Allgemeinen

mit etwa 1,50 angegeben wurde.

**[0128]** Der amorphe Zustand wird induziert, indem die Rate und Dauer des Fällvorgangs kontrolliert wird. Der erfindungsgemäße amorphe Hydroxyapatit wird aus der Lösung unter Bedingungen gefällt, bei denen das Fäll- len anfänglich schnell ist. Schnelles Kristall- oder Kornwachstum erhöht die Anzahl der Defekte in jedem Korn, wodurch die Solubilität steigt. Am extremen Ende des Spektrums ist das Kristall- oder Kornwachstum so schnell und die Defektdichte so erheblich, dass ein amorphes Calciumphosphat resultiert. Amorphes Calciumphosphat ist gelartig und umfasst feste Lösungen mit veränderlichen Zusammensetzungen. Diese Gele besitzen keine Fernordnung, sind jedoch im Angstrom-Maßstab homogen. Unter physiologischen Bedingungen besitzen diese amorphen Verbindungen hohe Löslichkeiten, hohe Bildungs- und hohe Raten der Umwandlung in PCA-Calciumphosphat.

**[0129]** Die nach diesem Verfahren hergestellten amorphen Calciumphosphatfeststoffe behalten ihre amorphe Art ausreichend lange, damit sie als im Wesentlichen amorphe Feststoffe in der endgültigen Reaktion eingesetzt werden können.

**[0130]** Nach einer Ausführungsform der Erfindung wird eine Lösung hergestellt, die Calcium- und Phosphationen und ein drittes Ion in einer Konzentration, bei einem pH-Wert und bei einer Temperatur enthält, die die schnelle Keimbildung und das schnelle Ausfällen von Calciumphosphat fördern. Wenn das Ausfällen ausreichend schnell ist, bildet sich ein amorphes, gelartiges Calciumphosphat. Da die thermodynamisch günstige kristalline Form des Hydroxyapatits begünstigt wird, wenn die Reaktionsrate vermindert wird, können verschiedene Verfahrensschritte zur Erhöhung der Reaktionsrate durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass eine amorphe Verbindung erhalten wird. Die folgenden Faktoren werden unter anderem in Betracht gezogen, wenn eine Lösung für das schnelle Ausfällen des amorphen Calciumphosphat gemäß der vorliegenden Erfindung konzipiert wird.

#### Bevorzugte Bedingungen

**[0131]** Schnelles Mischen von Calcium- und Phosphatquellen, um die Reaktionsrate zu erhöhen. Die Reaktionsrate wird erhöht, um nicht stabile Phasen als Produkt zu begünstigen. Wird jedem Ion mehr Reaktionszeit gelassen, um zur Bildung eines Feststoffes in korrekter Weise in Kontakt zu kommen, ergibt sich eine thermodynamisch günstigere, kristalline und stabile Struktur.

#### Bevorzugte Calcium- und Phosphatquellen

**[0132]** Die Verwendung von hochkonzentrierten oder fast übersättigten Lösungen gewährleistet, dass eine schnellere Reaktion abläuft.

#### Bevorzugte Temperatur

**[0133]** Die Reaktion kann zwar bei Raumtemperatur durchgeführt werden, Temperaturen in der Nähe des Siedepunkts zur Erhöhung der Konzentration eines Reaktanten sind jedoch ein mögliches Mittel, um die Reaktionsrate zu erhöhen.

**[0134]** In einer Ausführungsform wird eine wässrige Lösung von Calciumionen, Phosphationen und Carbonationen schnell vermischt, um einen Carbonat-haltigen amorphen Calciumphosphatfeststoff zu erhalten. Die relativen Konzentrationen der Ionen sind so gewählt, dass ein Niederschlag mit dem gewünschten Ca/P-Verhältnis erhalten wird. Das Carbonation ersetzt in dem amorphen Calciumphosphat ein Phosphation. Das Carbonat-haltige amorphe Calciumphosphat kann durch Fällen aus einer wässrigen Carbonatlösung erhalten werden. Geeignete wässrige Carbonatlösungen umfassen beispielsweise Bicarbonatlösungen, Natriumcarbonatlösungen, Kaliumcarbonatlösungen. Im Rahmen der Erfindung können außerdem nicht wässrige Lösungen verwendet werden.

**[0135]** Die Verwendung eines Carbonat-haltigen Materials ist zweckmäßig, da es die Manipulation des Ca/P-Verhältnisses durch Ersatz von  $\text{PO}_4^{3-}$  durch  $\text{CO}_3^{2-}$  ermöglicht. Außerdem ist bekannt, dass die Gegenwart von  $\text{CO}_3^{2-}$  das Auftreten der Kristallinität in dem amorphen Calciumphosphat verzögert. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass andere Ionen oder Gemische von Ionen anstelle der Carbonationen oder zusätzlich zu den Carbonationen geeignet sind, um das Ca/P-Verhältnis zu verändern und um reaktive Leerstellen in das amorphe Calciumphosphat einzubringen, wie beispielsweise Nitrat, Nitrit, Acetat,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ -Ionen.

**[0136]** Das gefällte amorphe Calciumphosphat kann gewonnen und vor der Aktivierung filtriert werden. Dieser Schritt wird vorzugsweise in einem kalten Raum oder bei Temperaturen unter Raumtemperatur durchgeführt, um den amorphen Zustand des gewonnenen Niederschlags zu bewahren. Die Gewinnung kann üblicherweise durch geeignete herkömmliche Mittel erfolgen, beispielsweise Schwerkraftfiltration, Vakuumfiltration oder Zentrifugation, ist jedoch nicht darauf beschränkt. Der gewonnene Niederschlag ist gelatineartig und er wird mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen.

**[0137]** Der gewaschene Niederschlag wird dann unter beliebigen Bedingungen getrocknet, die den amorphen Charakter des Materials bewahren. Gefriertrocknung ist geeignet, jedoch nicht die ausschließliche Technik. Während der Niederschlag gefroren bleibt, wird er beim Frieren getrocknet und der Großteil der erhaltenen Flüssigkeit wird entfernt. Dies kann erreicht werden, indem der gefrorene Niederschlag für eine vorgegebene Zeitspanne in eine Vakuumkammer gegeben wird. Die Gefriertrocknung erfolgt üblicherweise bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff für eine Zeitspanne im Bereich von 12–78 h und vorzugsweise etwa 24 Stunden und unter Vakuum im Bereich von  $10^{-1}$ – $10^{-4}$  und vorzugsweise  $10^{-2}$  Torr. Ein bevorzugtes Verfahren umfasst die Gefriertrocknung, da die üblicherweise bei der Lyophilisation eingesetzten tiefen Temperaturen die weitere Kristallisation des Materials verhindern. Das amorphe Calciumphosphat wird als Ergebnis als extrem feines, frei fließendes Pulver erhalten.

**[0138]** Das getrocknete ACP kann zu einem hochreaktiven ACP aktiviert werden. Wenn in dem ACP Carbonat vorliegt, kann das ACP-Pulver nach einer bevorzugten Ausführungsform erwärmt werden, um das verbleibende freie Wasser, Hydratwasser, auszutreiben und Kohlenstoff wahrscheinlich durch Zersetzung von  $\text{CO}_3^{2-}$  zu  $\text{CO}_2$  und Sauerstoff zu entfernen. Das Erwärmen erfolgt bei einer Temperatur unter  $500^\circ\text{C}$ , jedoch über  $425^\circ\text{C}$ , um zu verhindern, dass amorphes Calciumphosphat in kristallinen Hydroxyapatit umgewandelt wird. Das Erwärmen erfolgt vorzugsweise bei einer Temperatur im Bereich von  $450$ – $460^\circ\text{C}$  für 1 bis 6 Stunden und vorzugsweise 50 bis 90 Minuten.

**[0139]** In den meisten Ausführungsformen zur Herstellung des hier beschriebenen ACP wird der Einfachheit halber Atmosphärendruck eingesetzt. Im Rahmen der Erfindung kann jedoch auch zusammen mit geeigneten Temperaturen Vakuum eingesetzt werden.

**[0140]** Zur Bildung eines hochreaktiven ACP ist es zweckmäßig, während der gesamten ACP-Synthese die amorphe Eigenschaft des Materials beizubehalten. Wenn während des Verfahrens oder in dem Endprodukt Kristallinität insgesamt in erheblichem Maße (einkristalline Bereiche) oder sogar in lokalen Domänen (mikrokristalline Bereiche) eingeführt wird, ist der Feststoff weniger reaktiv geworden. Das resultierende hochreaktive Calciumphosphat ist amorph und weist ein Calcium-zu-Phosphat-Verhältnis im Bereich von 1,55 bis 1,65 auf. Nach einer bevorzugten Ausführungsform besitzt das amorphe Calciumphosphat ein Ca/P-Verhältnis von etwa 1,58.

**[0141]** Geringe Kristallinität und Leerstellen (Porosität und/oder stöchiometrische Veränderungen) können zur beobachteten höheren Reaktivität des erfindungsgemäßen amorphen Calciumphosphat beitragen. Dies wird durch die folgenden Beobachtungen gestützt: a) Es hat sich herausgestellt, dass ein Carbonat-haltiges amorphes Calciumphosphat, das auf  $525^\circ\text{C}$  erwärmt wurde, einen höheren kristallinen Anteil und entsprechend eine geringere Reaktivität aufweist. b) Amorphes Calciumphosphat, das nur auf  $400^\circ\text{C}$  erwärmt wurde, behält seine amorphe Charakteristik, zeigt jedoch eine geringere Reaktivität. c) Nicht Carbonat-haltige ACPs, die auf  $460^\circ\text{C}$  erwärmt wurden, wurden unter Verwendung der DCPD-Reaktion, wie in Beispiel 8 beschrieben, untersucht, wobei sie zwar mit einem starken DCPD-Promotor reaktiv, jedoch mit einem schwachen DCPD-Promotor unreaktiv waren.

**[0142]** Diese Beobachtungen legen nahe, dass sowohl die Amorphizität als auch der verminderte Kohlenstoffgehalt (Leerstellen) die Reaktivität beeinflussen. Dies soll keinesfalls eine ausschließliche Erklärung für die Reaktivität darstellen. Andere Grundlagen für die beobachtete Reaktivität werden vom Rahmen der Erfindung mitumfasst.

**[0143]** Das resultierende amorphe Calciumphosphatpulver ist ein hochreaktives amorphes Calciumphosphatmaterial mit einem Ca/P-Verhältnis von 1,1–1,9, vorzugsweise etwa 1,55 bis 1,65 und besonders bevorzugt etwa 1,58. Die [Fig. 17a](#) und [Fig. 17b](#) zeigen Infrarotspektren des amorphen Calciumphosphat nach der Lyophilisation ([Fig. 17a](#)) und nach der folgenden Wärmebehandlung bei  $450^\circ\text{C}$  während einer Zeitspanne von 1 h ([Fig. 17b](#)). Die Infrarotpeaks, die die Gegenwart von lokalen chemischen Gruppen in dem Material anzeigen, zeigen, dass die Gegenwart von H-O-H (bei etwa  $3400\text{ cm}^{-1}$  und  $1640\text{ cm}^{-1}$ ) und  $\text{CO}_3^{2-}$ -Gruppen (bei  $1420$ – $1450\text{ cm}^{-1}$ ) nach der Wärmebehandlung deutlich vermindert sind. Die Röntgenbeugungsbilder (XRD) in

Fig. 4a des wärmeaktivierten ACP zeigen jedoch, dass der amorphe Zustand nach dem Erwärmen und nach der Lyophilisation beibehalten wurde. Das XRD-Muster ist durch breite Peaks und einen undefinierten Untergrund ohne scharfe Peaks zwischen  $2\theta = 20$  bis  $35$  oder beliebigen Beugungswinkeln, die den bekannten kristallinen Calciumphosphaten entsprechen, gekennzeichnet.

[0144] Die unter Verwendung von wellenlängendispersiver Röntgenmikroanalyse an einer Elektronenmikrosonde durchgeführte Ca/P-Messung des gleichen Materials ergibt nach der Wärmebehandlung einen Ca/P-Wert von 1,58 (Fig. 2).

[0145] Diese Eigenschaften zeigen, dass die Amorphizität insgesamt während des Prozesses erhalten bleibt, obwohl es in den amorphen Calciumphosphatfeststoffen zu einer lokalen Veränderung bei einigen Gruppen kommt.

[0146] Das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat kann in einer Vielzahl von Formulierungen in einer Vielzahl von Anwendungen eingesetzt werden, wobei einige davon im Folgenden beschrieben werden.

#### Verbundmaterialien

[0147] Eine stark resorbierbare keramische Zusammensetzung kann bei der Wiederherstellung und Wachstumsförderung von Knochengewebe (Verbundmaterial zum Knochenersatz) verwendet werden. Die Zusammensetzung enthält ein biokompatibles und stark resorbierbares, wenigkristallines apatitisches (PCA, poorly crystalline apatitic)-Calciumphosphat zusammen mit einer geeigneten biokompatiblen Matrix oder Additiven.

[0148] Nach einem Aspekt stellt die Erfindung ein stark resorbierbares Verbundmaterial bereit, das ein bioresorbierbares PCA-Calciumphosphat und zusätzlich bioresorbierbare ergänzende Materialien enthält und das unter milden Reaktionsbedingungen bei Raumtemperatur oder Körpertemperatur (beispielsweise  $20-40^{\circ}\text{C}$ ) hergestellt werden kann. Das Verbundmaterial kann auf Oberflächen von Prothesen, die mit dem Knochen in Kontakt stehen, aufgebracht und als Knochenzement verwendet werden. Es kann direkt als Füllmaterial auf Knochendefekte aufgebracht werden, wo es befähigt ist, das Wachstum von neuem Knochengewebe zu fördern. Das Verbundmaterial kann alternativ hierzu verwendet werden, um Befestigungsmaterialien oder Vorrichtungen wie Schrauben und Platten herzustellen, die unter geeigneten Umständen resorbiert und durch Knochen ersetzt werden. Das Verbundmaterial kann auch als freistehendes Material in Nichtknochengewebe verwendet werden. Wenn zu dem Verbundmaterial ein pharmazeutischer Wirkstoff gegeben wird, dient es als Arzneimittelabgabesystem. Die Freisetzung des Wirkstoffs kann nach der Implantation über eine lange Zeitspanne erfolgen, wenn sich das Verbundmaterial langsam ersetzt. Siehe hierzu die Anmeldung U.S.S.N. 08/729,342 mit dem Titel "Delivery Vehicle".

[0149] Die vorliegende Erfindung verwendet ein stark resorbierbares und ossifizierendes PCA-Calciumphosphat, das als implantierbare Biokeramik für die Behandlung von Knochenerkrankungen und Verletzungen und anderen biologischen Anwendungen, die resorbierbares Calciumphosphat erfordern, zweckdienlich ist. "Vollständige" Resorption bedeutet, dass keine erheblichen extrazellulären Fragmente übrig bleiben. Der Resorptionsprozess umfasst die Beseitigung des ursprünglichen Implantatmaterials durch die Einwirkung von Körperflüssigkeiten, Enzymen oder Zellen. Resorbiertes Calciumphosphat kann beispielsweise als Knochenmineral wieder abgeschieden oder in anderer Weise im Körper wiederverwendet oder ausgeschieden werden. Bei den hier offenbarten Verbundmaterialien kann (beispielsweise mindestens 80%, vorzugsweise 95–99% und noch bevorzugter  $> 99\%$ ) die Gesamtmasse (wenigstens 1 g und vorzugsweise 1–5 Gramm) des implantierten PCA-Materials vorzugsweise innerhalb eines Jahres, noch bevorzugter innerhalb von 9 Monaten oder 6 Monaten, noch bevorzugter in weniger als 3 Monaten und besonders bevorzugt innerhalb 1 Monats resorbiert werden.

[0150] Das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat ist durch seine biologische Resorbierbarkeit und durch die Abwesenheit von erheblicher Kristallinität, wie oben diskutiert, gekennzeichnet. Sein kristalliner Charakter (im Vergleich mit dem höheren Grad an Kristallinität, der in dem Knochenersatzmaterial des Standes der Technik vorliegt) entspricht im Wesentlichen dem von natürlichem Knochen. Das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat ist außerdem biokompatibel, d. h., in dem Empfänger wird durch das implantierte Verbundmaterial keine erhebliche schädliche Reaktion (Entzündungen oder Fibrosen) ausgelöst. Materialien, die zu einem medizinisch akzeptablen Entzündungsniveau oder Fibroseniveau führen, werden als biokompatibel angesehen. Außerdem ist das Material bioaktiv, da an der Grenzfläche Empfänger/Verbundmaterial die Apposition von neuem Knochengewebe erfolgt.

**[0151]** Nach einem wichtigen Aspekt der Erfindung ist das erfindungsgemäße implantierbare biokeramische Material in einer chirurgischen Umgebung oder bei der Herstellung im Vergleich mit anderen, im Stand der Technik bekannten Verbundmaterialien zum Knochenersatz deutlich einfacher zu verwenden. Das mit der Bildung des PCA-Calciumphosphat einhergehende Abbinden kann genauer außerhalb des Körpers eingeleitet werden und schreitet bei Raumtemperatur langsam fort, wodurch jegliche Gefahr minimiert wird, dass das Material vor dem Erwärmen "abbindet" (beispielsweise vor der Anwendung in dem Operationsgebiet oder bei der Inkubation während der Herstellung). Das Abbinden wird bei etwa 37°C deutlich schneller und führt zur Härtung des Materials. Das gehärtete PCA-Calciumphosphat weist eine Durometerhärte und ein Kompressionsmodul ähnlich wie herkömmliche Zeichenkreide auf. Gelegentlich sind in dem gehärteten PCA-Material unumgesetzte Precursoren, Promotoren und/oder ergänzendes Material und Nebenprodukte vorhanden.

**[0152]** Durch die Formulierung des PCA-Materials als Verbundmaterial können die mechanischen Eigenschaften des Materials verbessert werden. In einigen Formulierungen ist das gehärtete PCA-Calciumphosphat alleine spröde und weist eine Durometerhärte und ein Kompressionsmodul ähnlich wie herkömmliche Zeichenkreide auf. Die Herstellung des PCA-Calciumphosphat als Verbundmaterial ist zweckmäßig, um die mechanischen Eigenschaften für einige medizinische Verwendungen zu verändern. Ferner können die Konsistenz, die Formbarkeit und die Härte des PCA-Calciumphosphat und die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von den therapeutischen Erfordernissen variiert werden, indem geeignete ergänzende Materialien gewählt werden, mit denen das erfindungsgemäße implantierbare biokeramische Verbundmaterial hergestellt wird.

#### Herstellung des implantierbaren biokeramischen Verbundmaterials

**[0153]** Das erfindungsgemäße Verbundmaterial wird hergestellt, indem das erfindungsgemäße Calciumphosphat mit einem gewählten ergänzenden Material kombiniert wird. Das PCA-Calciumphosphat kann als Verstärkungsmaterial, Matrix oder beides dienen. Das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat behält in seiner ursprünglichen Pastenform (d. h. als hydratisierter Precursor) in der Regel einen pH-Wert von etwa 6–7 und ist daher mit einer breiten Auswahl von Zusatzstoffen kompatibel, ohne dass es zu schädlichen Effekten kommt. Das ergänzende Material wird auf der Basis seiner Kompatibilität mit dem Calciumphosphat und seiner Fähigkeit ausgewählt, um dem Verbundmaterial (biologische, chemische oder mechanische) Eigenschaften zu geben, die für einen speziellen therapeutischen Zweck gewünscht werden. Das ergänzende Material kann beispielsweise ausgewählt werden, um die Bruchfestigkeit und Härte zu verbessern, die Risszähigkeit zu erhöhen, die Elastizität zu verändern, Darstellungsmöglichkeiten zur Verfügung zu stellen und/oder die Fließeigenschaften und Aushärtzeiten des PCA-Calciumphosphat zu verändern.

**[0154]** Das ergänzende Material kann in unterschiedlichen Mengen und in einer Vielzahl von physikalischen Formen zu dem PCA-Calciumphosphat gegeben werden, die von der jeweiligen therapeutischen Verwendung abhängen. Beispielsweise kann das ergänzende Material in Form von Schwämmen (poröse Struktur), Netzen, Filmen, Fasern, Gelen, Filamenten oder Partikeln, einschließlich Mikro- und Nanopartikeln, vorliegen. Das ergänzende Material kann selbst ein Verbundmaterial sein. Das ergänzende Material kann als partikelförmiges oder flüssiges Additiv oder Dotierstoff verwendet werden, der mit dem resorbierbaren PCA-Calciumphosphat innig vermischt wird. Das ergänzende Material kann für das PCA-Calciumphosphat als Matrix dienen, das in der Matrix eingebettet oder dispergiert wird. Alternativ kann das PCA-Calciumphosphat als Matrix für das ergänzende Material dienen, das darin dispergiert wird. Das ergänzende Material kann als Beschichtung auf einem PCA-Calciumphosphat-Körper, beispielsweise als Beschichtung nach der Herstellung aufgebracht werden, um die Resorptionszeit zu verlängern oder die Eigenschaften des biokeramischen Materials in anderer Weise zu verändern. Schließlich kann das ergänzende Material auch mit dem PCA-Calciumphosphat beschichtet werden.

**[0155]** Das ergänzende Material ist möglichst biokompatibel, d. h., es gibt keine schädlichen Reaktionen, die von dem Material ausgelöst werden, wenn es in den Empfänger eingebracht wird.

**[0156]** Es ist meistens wünschenswert, dass das ergänzende Material ebenfalls bioresorbierbar ist. In vielen bevorzugten Ausführungsformen hat das ergänzende Material eine Affinität zu Calcium, Phosphat oder Calciumphosphaten, durch die die Festigkeit der Grenzfläche PCA-Calciumphosphat/ergänzendes Material verbessert wird. Die Affinität kann spezifisch oder durch unspezifische ionische Wechselwirkungen vermittelt sein. Für eine Verwendung als Matrix in dem Kompositmaterial geeignete bioerodierbare Polymere sind beispielsweise Collagen, Glykogen, Chitin, Cellulosen, Stärke, Keratine, Seide, Nucleinsäuren, entmineralisierte Knochenmatrix, derivatisierte Hyaluronsäure, Polyanhydride, Polyorthoester, Polyglykolsäure, Polymilchsäure und deren Polymere, sie sind jedoch darauf nicht beschränkt. Besonders Polyester von  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren, wie Poly(L-lactid) (PLLA), Poly(D,L-lactid) (PDLLA), Polyglykolid (PGA), Poly(lactid-co-glykolid) (PLGA), Po-



ly(D,L-lactid-co-trimethylencarbonat) und Polyhydroxybutyrat (PHB), und Polyanhydride, wie Poly(anhydrid-co-imid) und deren Copolymere sind als bioerodierbar bekannt und für die Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung geeignet. Außerdem können bioaktive Glaszusammensetzungen, wie Zusammensetzungen mit  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  und/oder  $\text{CaF}_2$  in Kombination mit dem erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat verwendet werden. Andere zweckdienliche bioerodierbare Polymere sind etwa Polysaccharide, Peptide und Fettsäuren.

**[0157]** Bioerodierbare Polymere werden vorteilhaft für die Herstellung von bioresorbierbaren Gegenständen verwendet, wie beispielsweise Marknägel, Stifte, Schrauben, Platten und Anker für die Implantation an dem Knochenort, sie sind jedoch nicht darauf beschränkt. Nach bevorzugten Ausführungsformen der bioresorbierbaren Gegenstände ist das ergänzende Material selbst bioresorbierbar und wird zu dem PCA-Calciumphosphat in Partikelform oder in Form von Fasern in Volumenanteilen von 1–50% und vorzugsweise 1–20 Gew.-% gegeben. In einigen bevorzugten Ausführungsformen liegt die bioresorbierbare Faser in Form von Whiskern vor, die mit den Calciumphosphaten gemäß den Prinzipien des im Stand der Technik bekannten Designs und der Herstellung von Verbundmaterialien wechselwirken. Solche Gegenstände können geformt werden, indem ein Gemisch aus den Partikeln des PCA-Calciumphosphat in Pulverform und dem Polymer gepresst wird. Nach einer anderen Ausführungsform wird ein PCA-Calciumphosphat mit PLLA-Fasern verstärkt, wobei PLLA-Fasern verwendet werden, die den von Törmälä et al. zur Herstellung von bioabbaubaren, selbstverstärkenden Verbundmaterialien beschriebenen Fasern (Clin. Mater. 10: 29–34 (1992)) ähnlich sind.

**[0158]** Das implantierbare biokeramische Verbundmaterial kann durch Zugabe eines Fluids, wie Wasser oder einer physiologischen Flüssigkeit, zu einem Gemisch aus dem PCA-Calciumphosphat und einem ergänzenden Material als Paste hergestellt werden. Alternativ hierzu kann ein Gemisch aus dem ergänzenden Material und den hydratisierten Precursorpulvern und dem PCA-Calciumphosphat als Paste oder Kittmasse hergestellt werden. Wenn das ergänzende Material in einer PCA-Calciumphosphat-Matrix dispergiert oder einer solchen Matrix umgesetzt wird, kann Wasser zu einem der Calciumphosphat-Precursoren zur Bildung einer hydratisierten Precursorpaste gegeben werden, wobei die resultierende Paste mit dem ergänzenden Material vermischt und dann die zweite Calciumphosphatquelle zugegeben wird. Die Calciumphosphatquellen, die den PCA-Precursor in Pulverform bilden, können alternativ hierzu auch vorgemischt werden, worauf dann Wasser zugegeben und anschließend das ergänzende Material eingearbeitet wird. In den Fällen, bei denen es wünschenswert ist, dass das ergänzende Material als Matrix dient, wird das vollständig ausgehärtete PCA-Calciumphosphat in der gewünschten Form, bei der es sich meistens um eine Form mit kontrollierter Partikelgröße handelt, hergestellt und direkt zu der matrixbildenden Reaktion gegeben (beispielsweise zu quellendem Collagen). Diese Materialien können dann in Formen eingebracht oder in anderer Weise in die gewünschte Form gebracht und bei Temperaturen im Bereich von 35–100°C gehärtet werden. Ein besonders zweckdienlicher Ansatz besteht darin, die Paste aus dem Verbundmaterial-Precursor in die ungefähre Form oder Größe zu bringen und das Material dann in einer feuchten Umgebung bei 37°C zu härten. Das gehärtete Verbundmaterial kann dann gefräst oder bearbeitet werden, um die für die Verwendung bei dem chirurgischen Eingriff gewünschte Form zu erhalten. Die Menge des partikelförmigen PCA-Calciumphosphat, die in die Matrix aus dem ergänzenden Material eingebracht wird, wird meistens empirisch ermittelt, indem die physikalischen Eigenschaften des gehärteten Verbundmaterials nach im Stand der Technik bekannten Standards getestet werden.

**[0159]** Nach bevorzugten Ausführungsformen werden die Reaktanten außerhalb des Körpers vermischt, wodurch ein verformbares Verbundmaterial erhalten wird, das ein hydratisiertes Precursormaterial enthält, welches eine physikalische Beschaffenheit hat, die für die Anwendung bei einem chirurgischen Eingriff geeignet ist.

**[0160]** Die Umwandlung in das PCA-Material ist im Allgemeinen nach der Applikation an dem Operationsbereich vollständig. Das ergänzende Material liegt im Allgemeinen in der endgültigen Form vor, wenn es zu dem PCA-Calciumphosphat oder zu der hydratisierten Precursorpaste gegeben wird, wobei die Verwendung von Polymermonomeren und Precursoren, die zu der Paste gegeben werden, von der vorliegenden Erfindung mitumfasst werden. Nach einer bevorzugten Ausführungsform wird die Umwandlungsreaktion initiiert, indem zu einem Gemisch von trockenen Precursorkomponenten destilliertes Wasser gegeben wird, um einen dicken hydratisierten Precursor in Form einer Paste oder Kittmasse zu bilden. Andere wässrige Stoffe, wie Puffer, Salzlösungen, Serum oder Gewebekulturmedien können anstelle von destilliertem Wasser verwendet werden. Nach anderen bevorzugten Ausführungsformen kann Wasser in einer Menge zu den Precursorpulvern gegeben werden, die ausreichend ist, damit eine Paste gebildet wird, die mit einer Injektionsnadel Nr. 18 leicht zu injizieren ist. Die erfindungsgemäßen biokeramischen Verbundmaterialien härten im Allgemeinen in weniger als fünf Stunden und härten im Wesentlichen in etwa eins bis fünf Stunden unter physiologischen Bedingungen und vorzugsweise in etwa 10–30 Minuten. Das resultierende bioresorbierbare PCA-Calciumphosphat ist im



Vergleich mit dem idealen stöchiometrischen Wert von etwa 1,67 für Hydroxyapatit calciumarm mit einem Calcium-zu-Phosphat-Verhältnis von weniger als 1,5.

**[0161]** Die Erfindung gibt auch einen Test zur Identifizierung eines geeigneten reaktiven PCA-Calciumphosphat und reaktiver Precursoren für die Verwendung in den erfindungsgemäßen Verbundmaterialien an. Die Precursoren werden genauer vereinigt, mit einer begrenzten Wassermenge (so dass eine Paste oder Kittmasse gebildet wird) hydratisiert und zu einem PCA-Material härten gelassen. Erstrebenswerte Precursoren können in einer feuchten Umgebung bei Körpertemperatur oder etwa Körpertemperatur in weniger als 5 Stunden und vorzugsweise in 10–30 Minuten härten. Komponenten, die auf diese Weise härten, können dann intramuskulär oder subkutan in ein Versuchstier eingebracht und auf ihre biologische Resorbierbarkeit überprüft werden. Erstrebenswerte Materialien sind Materialien, die nach Implantation als 1–5 g Pellet innerhalb eines Jahres mindestens zu 80% (vorzugsweise 95–99% und noch bevorzugter > 99%) resorbiert werden. Es ist im Allgemeinen leichter, die Resorption von Grammengen des Materials an subkutanen Einsatzorten zu testen.

**[0162]** Medizinische Vorrichtungen, die aus den erfindungsgemäßen Verbundmaterialien unter Verwendung von bioresorbierbaren ergänzenden Materialien hergestellt wurden, sind selbst bioresorbierbar und nach bevorzugten Ausführungsformen stark resorbierbar. Die in diesen Vorrichtungen verwendeten Verbundmaterialien können so ausgelegt sein, dass sie den Vorrichtungen die gewünschten mechanischen Eigenschaften geben, so dass sie bei dem chirurgischen Einsatz zweckdienlich sind (beispielsweise orthopädische Stifte und Schrauben). Nach dem Anbringen in dem Empfänger werden die Vorrichtungen allmählich durch Knochengewebe ersetzt, d. h., es kommt zur Ossifikation des Knochenorts. Dies steht im Gegensatz zu Materialien, die nur biokompatibel sind, und bei denen die Vorrichtung die Apposition des Knochengewebes an seiner Oberfläche fördert, jedoch nicht resorbiert und so der Implantationsort ossifiziert wird. Die Resorptionszeit in vivo hängt im Allgemeinen sowohl von dem jeweiligen ergänzenden Material als auch der Größe und dem Ort des Transplantats ab, bei Verbundmaterialien mit weniger als 20 (Vol/Vol) ergänzendes Material ist die Resorption des PCA-Calciumphosphat und die Ossifikation des Implantationsorts im Allgemeinen nach weniger als sechs Monaten und meistens in etwa einem Monat abgeschlossen. In manchen Fällen ist das resorbierbare ergänzende Material noch in dem neu gebildeten Knochen eingebettet und wird somit über eine längere Zeitspanne als das PCA-Calciumphosphat resorbiert. Die Verwendung von resorbierbaren Gegenständen vermeidet das Erfordernis eines nachfolgenden chirurgischen Eingriffs zur Entfernung der Vorrichtung.

**[0163]** Die Resorbierbarkeit des implantierbaren biokeramischen Verbundmaterials gemäß der vorliegenden Erfindung kann zum Teil der Porosität, der Kristallinität und der chemischen Zusammensetzung seiner Komponenten zugeschrieben werden. Das erfindungsgemäße biokeramische Verbundmaterial umfasst ein wenigkristallines apatitisches Calciumphosphat, das im Wesentlichen dem Calciumphosphat entspricht, das in natürlichen Knochen vorliegt. Die mangelnde Kristallinität in Apatiten ist im Vergleich mit anderen kristallinen Arten mit einer etwas höheren Löslichkeit in wässrigen Systemen verbunden und es kann daher angenommen werden, dass die niedrige Kristallinität und/oder die Gegenwart von stabilen amorphen apatitischen Domänen ihre Resorbierbarkeit in biologischen Systemen fördert. Die Porosität erleichtert die Penetration von Zellen, das Vordringen von Zellen in die Knochenersatzmaterialmatrix und die Diffusion von Substanzen in das Innere der Matrix und aus dem Inneren der Matrix heraus. Daher werden Verbundmaterialien mit niedriger Porosität in vivo langsamer resorbiert als solche mit hoher Porosität.

**[0164]** In bevorzugten Ausführungsformen können die Vorrichtungen und Gegenstände zur Optimierung der Ossifikation mit knochenbildenden Zellen angeimpft werden. Dies ist am einfachsten zu erreichen, indem die Vorrichtung mit einer Quelle von patienteneigenen knochenbildenden Zellen in Kontakt gebracht wird. Solche Zellen können in knochenassoziiertem Gewebe, Blut und Flüssigkeiten vorliegen, einschließlich exogenen Fluiden, die mit Knochengewebe oder Knochenmaterial oder Bereichen, einschließlich Periosteum, Spongiosa oder Knochenmark in Kontakt waren. Im Falle von Vorrichtungen, wie Schrauben und Stiften, ist kein weiteres Animpfen erforderlich, da ihr Einbringen in den Knochen mit einer Verletzung des Periosteum und/oder Blutungen verbunden ist. Für Platten, die dem Rindenknochen nur gegenüberliegen, ist eine periosteale Läsion in Kontakt mit der Vorrichtung zu empfehlen. In weiteren Ausführungsformen kann es zweckmäßig sein, chirurgisch eine Aussparung im Knochen zu bilden, indem ein Teil des Rindenknochens am Implantationsort entfernt wird. Es können auch andere Schritte unternommen werden, um die Ossifikation zu verbessern, wie z. B. das Einbringen von knochenbildenden Zellen in das Transplantat, die von dem Patienten selbst gewonnen wurden, oder das Einbringen von Nahrungsfaktoren oder Wachstumsfaktoren wie Proteinen in die Vorrichtung oder auf die Vorrichtung. Auch die Verwendung von nicht autologen Knochenzellen wird von der Erfindung umfasst, wenn der gewünschte Grad der Knochenregeneration vor der Abstoßung der knochenbildenden Zellen durch den Empfänger auftritt. Zellen oder Gewebe aus Primärquellen, Zelllinien oder Zellbanken können daher bei einigen Ausführungsformen zweckmäßig sein; siehe US-Patentanmeldung U.S.S.N. 08/729,354 mit dem Titel

"Cell Seeding in Ceramic Compositions".

**[0165]** Für die Herstellung von Knochenzement oder Kittmassen zur Verwendung bei Belastungen können auch bioresorbierbare Polymere verwendet werden. Es können ergänzende Materialien zu dem Verbund gegeben werden, um die Kompressibilität und die Belastungseigenschaften des Knochenzements zu erhöhen. Es können insbesondere Kohlenstofffasern oder andere verstärkende Fasern zu dem Verbundmaterial gegeben werden. Für die Herstellung von faserverstärkten Knochenzementen kann ein Plasmaätzen der Fasern vorteilhaft sein, um die Qualität und Stärke der Calciumphosphat/Faser-Grenzfläche zu verbessern. PCA-Calciumphosphat kann auch bei 37°C in Pulverform oder in anderer Weise fragmentiert gehärtet und mit bekannten Bindemitteln vermischt werden, beispielsweise Knochenzementen, Füllstoffen, Gips, Epoxyharzen und anderen Calciumphosphaten, oder Gelen, wie beispielsweise Calciumsulfat, Tricalciumphosphat, Tetracalciumphosphat, Alginat, Collagen oder im Handel erhältlichen Produkten, wie Endobone (Merck), Hapset (Lifecore Biomedical), SRS (Norian), Bonesource (Leibinger), Collograft (Zimmer), Osteograf (CereMed) und Simplex (Howmedica), wobei die Erfindung natürlich nicht auf diese Produkte beschränkt ist. Wenn bei einigen Anwendungen das gehärtete PCA-Calciumphosphat in dem Binder dispergiert wird, wird der Binder meistens nach im Stand der Technik bekannten Verfahren hergestellt und mit dem PCA-Calciumphosphat in Partikelform in etwa gleichen Volumenanteilen vermischt, wobei die tatsächlichen Mengenanteile in im Stand der Technik bekannter Weise verändert werden, um Zusammensetzungen mit der gewünschten Konsistenz, Verarbeitbarkeit und Haftung herzustellen.

**[0166]** In einer anderen Ausführungsform kann geflochtenes Nahtmaterial, das in der Regel aus Polyester hergestellt ist, mit dem erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat beschichtet werden, um seine Biokompatibilität zu verbessern. Beschichtetes Nahtmaterial kann hergestellt werden, indem das Nahtmaterial in eine Aufschlammung eingetaucht wird, die fein verteiltes partikelförmiges PCA-Calciumphosphat enthält. Die Affinität des Nahtmaterials für die PCA-Calciumphosphat-Beschichtung kann verbessert werden, indem entweder das Nahtmaterial oder die PCA-Calciumphosphatpartikel oder beide an der Oberfläche behandelt werden. Oberflächenbehandlungen umfassen Plasmaätzen und/oder chemisches Pfropfen.

**[0167]** Bei einer anderen Ausführungsform wird ein Verbundmaterial angegeben, das PCA-Calciumphosphat und ein nicht resorbierbares oder kaum resorbierbares Material enthält. Geeignete nicht erodierfähige oder wenig erodierbare Materialien umfassen Dextrane, Polyethylen, Polymethylmethacrylat (PMMA), Kohlenstofffasern, Polyvinylalkohol (PVA), Poly(ethylenterephthalat)polyamid, Biogläser und die Verbindungen, die für die Verwendung in Knochenzementen oder Kittmassen aufgelistet wurden. Nach einer Ausführungsform können Kohlenstofffasern verwendet werden, um das PCA-Calciumphosphat zu verstärken. Bei solchen Anwendungen werden Faserlängen von 0,05 µm bis 20 cm und Fasergehalte üblicherweise im Bereich von 0,01–50 Vol.-% eingesetzt, wobei die Wahl von der jeweiligen Anwendung abhängt.

**[0168]** Eine weitere Verwendung besteht darin, zweckmäßige Gegenstände, wie beispielsweise einen Stift oder ein verstärkendes Netz, dauerhaft in den Knochen selbst einzubetten. Der Gegenstand dient als Verankerung für das stabile Anbringen an natürlichen Knochen. Dies ist für die Befestigung von Bändern und Sehnen an Knochengewebe besonders günstig. Gegenstände, die eine bioresorbierbare und ossifizierende oder dentale Prothese mit PCA-Calciumphosphat und einen geeigneten nicht resorbierbaren Gegenstand umfassen, können in den Knochen eingebracht und mit zusätzlichem PCA-Calciumphosphat oder Verbundmaterial in einer Knochenzementformulierung noch weiter befestigt werden. Das Teil wird dann durch Reossifizierung des PCA-Calciumphosphat in den Knochen eingebettet.

**[0169]** Calciumphosphate, z. B. Hydroxyapatite, Tricalciumphosphat und Tetracalciumphosphat, können als nicht resorbierbare ergänzende Materialien in den erfindungsgemäßen Verbundmaterialien verwendet werden, insbesondere, um die Biokompatibilität des Verbundmaterials zu erhalten. In diesen Ausführungsformen sind die Calciumphosphate höchstwahrscheinlich nicht resorbierbar und werden als Feststoff, faserartige Gebilde oder andere vorgeformte Gebilde vorgehärtet. Diese festen Calciumphosphatadditive können ferner komprimiert, gesintert oder in anderer Weise modifiziert werden, bevor sie mit dem PCA-Calciumphosphat vermischt werden.

**[0170]** Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird eine Zusammensetzung hergestellt, indem das PCA-Calciumphosphat mit einem Zusatzstoff innig vermischt wird, der die Resorptionseigenschaften, Abbindezeit und/oder Fließeigenschaften des Verbundmaterials verändert. Es können beispielsweise ein Siliconöl oder andere schmierende Polymere oder Flüssigkeiten in das Verbundmaterial eingearbeitet werden, um die Fließeigenschaften des Verbundmaterials zu verbessern, sodass es über eine Spritze dem Empfänger verabreicht werden kann. Der Schmierstoff ist vorzugsweise bioverträglich und sollte vorzugsweise aus dem Kno-

chenersatzmaterial nach der Verfestigung des PCA-Calciumphosphat in vivo schnell ausgewaschen werden. Geeignete Schmierstoffe umfassen beispielsweise Polymerwachse, Lipide, grenzflächenaktive Stoffe und Fettsäuren. Schmierstoffe können in Konzentrationen von etwa 0,1 bis etwa 30 Gew.-% verwendet werden.

**[0171]** Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung enthält der Verbundwerkstoff ein PCA-Calciumphosphat und ein radiographisches ergänzendes Material zur Darstellung des Implantats in vivo. Geeignete elektronendichte Materialien umfassen im Stand der Technik bekannte Materialien, wie Titanoxid und Bariumoxid, in klinisch relevanten Konzentrationen.

**[0172]** Nach einer bevorzugten Ausführungsform kann das biokeramische Material mit einem Young-Modul ähnlich wie Knochen hergestellt werden, indem ein Polyethylenverbundwerkstoff hergestellt wird, der das erfindungsgemäße resorbierbare PCA-Calciumphosphat enthält. Gemäß weiteren bevorzugten Ausführungsformen kann ein resorbierbares Polymer, wie Poly(L-lactid) oder Collagen, verwendet werden, um ein Verbundmaterial mit ähnlichen Eigenschaften wie normaler Knochen herzustellen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das partikelförmige PCA-Calciumphosphat in die gewünschte Form gepresst und der verdichtete Körper wird mit dem ergänzenden Material imprägniert.

**[0173]** Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die hydratisierten Precursormaterialien des PCA-Calciumphosphat mit dem ergänzenden Material vermischt und die Umwandlung in das biokeramische Material wird in Gegenwart des ergänzenden Materials ausgelöst. Im Allgemeinen liegt das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat in dem Verbundwerkstoff in einem Volumenanteil von weniger als 0,7 und vorzugsweise weniger als 0,5 vor.

**[0174]** Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann gemäß beliebigen herkömmlichen Verfahren hergestellt werden, die zur Herstellung von Verbundmaterialien zweckdienlich sind, einschließlich Vermischen, Vermengen, Legieren, Laminieren, Wickeln und Pultrudieren. Eine Vielzahl von Ansätzen zum Design und der Herstellung von polymeren/anorganischen Verbundmaterialien, Fasern und Matrixharzen und andere Verstärkungstechnologien sind zweckmäßig und im Stand der Technik bekannt. Eine Anleitung für die Herstellung von HA/Polyethylen-Verbundmaterialien kann bei Bonfield in Introduction of Bioceramics, S. 299–303 und den dort genannten Referenzen gefunden werden. Weitere Anleitungen sind in den folgenden Quellen angegeben: Jang, Advanced Polymer Composites: Principles and Applications, ASTM Int'l, Materials Park, OH (1994); Opi-la et al., Hrsg., Polymer/Inorganic Interfaces, Materials Research Soc., Pittsburgh, PA (1993); Saifullin, Physical Chemistry on Inorganic, Polymeric and Composite Materials, Ellis Horwood, N. Y. (1992); Ducheyne et al. in Introduction to Bioceramics, Hench and Wilson, Hrsg. World Scientific Publishing, N. J. S. 281–298 (1993); und TOrm111, Clin. Materials 10: 29–34 (1992).

**[0175]** Das biokeramische Verbundmaterial kann auch mit veränderlichen Porositätsgraden hergestellt werden. Nach einer Ausführungsform führt die Verwendung eines trockenen Gemisches von Reaktanten mit eingestellter Partikelgröße zu einem porösen Verbundmaterial. Weitere Verfahren zur Förderung der Porosität, wie beispielsweise chemisches oder physikalisches Ätzen und Auslaugen, können verwendet werden.

**[0176]** Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann ein Gemisch aus PCA-Calciumphosphat und einem polymeren ergänzenden Material durch herkömmliche Polymerextrusionsverfahren zur Bildung von Röhren, Fasern und anderen Formen extrudiert werden. Zum Zwecke der Extrusion ist das ergänzende Material vorzugsweise ein organisches Polymer. Falls eine bessere Bruchfestigkeit, ein besseres Modul und höhere Festigkeit gewünscht werden, kann das Verbundmaterial extrudiert oder in anderer Weise mechanisch verformt werden, um die Polymerketten zur Verbesserung der Festigkeit des Verbundmaterials auszurichten. Das Verbundmaterial kann auch unter Druck und/oder Wärme gehärtet werden, so dass ein Verbundmaterial erhalten wird, das dichter und fester ist und in vivo mit einer geringeren Rate resorbiert wird. Im Allgemeinen sollten Bedingungen vermieden werden, die zu einer raschen Umwandlung von PCA-Calciumphosphat in kristallineres HA führen.

**[0177]** Für manche Ausführungsformen kann es günstig sein, die Oberfläche des PCA-Calciumphosphat und/oder des ergänzenden Materials zu modifizieren, um die Grenzfläche zwischen den beiden Materialien und/oder die Affinität für pharmazeutische Wirkstoffe, beispielsweise Proteine, für das Verbundmaterial zu verbessern. Das erfindungsgemäße Calciumphosphat kann beispielsweise mit Einheiten gepropft werden, die eine Affinität für Proteine und andere organische Moleküle zeigen. Alternativ kann das Verbundmaterial an der Oberfläche behandelt werden, beispielsweise durch Plasmaätzen, um die Grenzflächen zwischen den beiden Phasen zu verbessern, wie dies im Stand der Technik bekannt ist.

**[0178]** Bei einigen Ausführungsformen, bei denen das Verbundmaterial vor seiner chirurgischen Verwendung

hergestellt und gehärtet wird und falls eine Lagerung gewünscht wird, kann es günstig sein, die Stabilität des wenigkristallinen Zustands des Verbundmaterials zu erhöhen. In solchen Fällen kann es günstig sein, das vorgeformte Verbundmaterial Kristallisationsinhibitoren auszusetzen. Die Inhibitoren können in das wässrige Medium gegeben werden, das verwendet wird, um das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat herzustellen, oder das fertige Verbundmaterial oder die daraus hergestellten Gegenstände können nach der Herstellung einer inhibierenden Substanz ausgesetzt werden. Geeignete Inhibitoren sind z. B. das Magnesiumion, Carbonation, Poly-L-glutamat, Polyacrylat, Phosvitin, Casein und Proteinpolysaccharide, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Für die Verwendung solcher Verbindungen kann auf LeGeros in Monographs in Oral Science, Bd. 15, S. 84–107; LeGeros Prog. Crystal Growth Charact. 4: 1–45 (19810; und Termine et al., Arch. Biochem. Biophys. 140: 318–325 (1970) verwiesen werden.

**[0179]** Das erfindungsgemäße Verbundmaterial kann auch als Arzneimittelabgabesystem verwendet werden, wenn eine biologisch wirksame Substanz in das Verbundmaterial eingebracht wird. Für weitere Details wird auf die ebenfalls anhängige Patentanmeldung U.S.S.N. 08/72,342 mit dem Titel "Drug Delivery Device" verwiesen.

#### Orthopädische und dentale Apparate

**[0180]** Das stark resorbierbare keramische Material kann für die Wiederherstellung und Wachstumsförderung von Knochengewebe, d. h., als Knochenersatzmaterial, verwendet werden. Gemäß einem Aspekt wird ein orthopädisches oder dentales Implantat an einem Implantationsort eingebracht und es kann gezeigt werden, dass es stark bioresorbierbar ist, hervorragend reossifiziert und es zum Einwachsen von Knochengewebe sowohl von Substantia compacta als auch trabekulären Knochen an dem Implantationsort kommt. Das erfindungsgemäße orthopädische oder dentale Implantat besteht aus einem synthetischen, stark bioresorbierbaren, wenigkristallinen apatitischen Calciumphosphatmaterial. Nach bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich um das Material, das in den ebenfalls anhängigen Anmeldungen U.S.S.N. 08/650,764 und/oder U.S.S.N. 08/446,182, die nun als US-Patent Nr. 5,650,176 erteilt wurden, und/oder der Anmeldung mit dem Titel "Method and Products Related to the Physical Conversion of Reactive Amorphous Calcium Phosphate", U.S.S.N. 08/729,344 beschrieben wurden.

**[0181]** Ein stark bioresorbierbares und reossifizierendes PCA-Calciumphosphat kann als implantierbare Bio-keramik für die Behandlung von Knochenerkrankungen und Zahnerkrankungen und Knochenverletzungen und Zahnverletzungen und weiteren biologischen Anwendungen eingesetzt werden. Das Implantat ist für eine Vielzahl von Behandlungen zweckmäßig. Das keramische Material kann beispielsweise auf Oberflächen von Prothesen, die mit Knochengewebe in Kontakt kommen, als Knochenzement aufgebracht werden, wobei das keramische Material natürlich nicht auf dieses Beispiel beschränkt ist. Es kann als Füllmaterial direkt an Knochendefekten aufgebracht werden, wo es befähigt ist, das Wachstum von neuem Knochengewebe zu fördern. Es kann bei Zahnfächern angewandt werden, um Probleme, die bei Zahnextraktionen auftreten, zu vermeiden, wie Zahnfachentzündungen, und/oder ein fixiertes Substrat bereitzustellen, auf dem ein Zahnersatz verankert werden kann. Alternativ hierzu kann das PCA-Material verwendet werden, um Befestigungen oder Vorrichtungen, wie Schrauben und Platten herzustellen, die resorbiert und durch Knochengewebe ersetzt werden. Wenn ein pharmazeutischer Wirkstoff zu dem Verbundmaterial gegeben wird, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren oder Antibiotika, dient es als Arzneimittelabgabesystem. Die Freisetzung des Wirkstoffs kann über einen langen Zeitraum nach der Implantation erfolgen, da das PCA-Material langsam biologisch zersetzt wird; siehe die zugehörige Anmeldung U.S.S.N. 08/729,342 mit dem Titel "Delivery Vehicle".

**[0182]** Ein unter Verwendung des erfindungsgemäßen PCA-Materials hergestelltes Implantat ist stark bioresorbierbar, d. h. mindestens 80% (vorzugsweise 95–99% und noch bevorzugter > 99%) der Masse des implantierten PCA-Materials wird innerhalb eines Jahres nach der Implantation resorbiert. Das Resorptionsprofil kann verändert werden, indem die Eigenschaften des PCA-Materials verändert werden, beispielsweise Porosität, Zusammensetzung, Kristallinität und dergleichen, so dass wenigstens ein Gramm (vorzugsweise 1–5 Gramm) des PCA-Materials zu mindestens 80% innerhalb von 12 Monaten, 9 Monaten, 6 Monaten, 3 Monaten oder idealerweise 1 Monat nach der Implantation resorbiert ist.

**[0183]** Ferner fördert das aus dem erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat hergestellte Implantat das Einwachsen von neuem Knochengewebe am Implantationsort sehr stark. Viele derzeitige Knochenimplantatmaterialien, beispielsweise bioresorbierbare organische Polymere, fördern die Knochenapposition an der Implantatoberfläche kaum. Das erfindungsgemäße Implantat fördert dagegen das Wachstum von neuem Knochengewebe im Implantat selbst. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl trabekulärer Knochen als auch Rindenknochen (Kortex oder äußere Knochenschicht) wächst. Erhebliches Einwachsen tritt innerhalb von Tagen nach der Implantation auf. Fast das gesamte Implantat wurde innerhalb von sechs Monaten und idealerweise

innerhalb von einem Monat nach der Implantation durch neues Knochengewebe erfasst. Gewicht tragende Knochen tendieren dazu, schneller zu regenerieren als nicht belastete Knochen. Das Einwachsen an den letztgenannten Knochen kann daher etwas langsamer erfolgen.

**[0184]** Das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat ossifiziert. Ossifikation bezieht sich auf den Ersatz von implantiertem synthetischen Calciumphosphat durch Knochengewebe, das histologisch ähnlich oder mit natürlichem Knochen identisch ist. Die Ossifikation des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat erfolgt eher in Stufen, wobei unorganisierteres Knochengewebe vorkommt, bevor natürlicheres Gewebe auftritt. Das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat unterscheidet sich von vorhergehenden Knochenfüllmaterialien und Knochenzementen, da die Knochenbildung nicht nur an der äußeren Grenze des Implantats auftritt, sondern anzunehmenderweise in Kombination mit dem Resorptionsprozess gleichzeitig im gesamten Implantat in Gang gebracht wird. Innerhalb von zwei bis drei Wochen nach der Implantation des PCA-Materials in einen belasteten Bereich, beispielsweise Tibia oder Radius, wird eine einleitende Ossifikation beobachtet, da sich kleine Bereiche von mineralisiertem osteoidem Gewebe (Spiculabildung) bilden. Nach vier Wochen sind die Spicula durch spitzenartige dünne trabekuläre Spongiosa und dünne Rindenknochen ersetzt. Nach sechs Wochen ist geordneter normaler oder dicker als normaler kompakter Rindenknochen mit Lacunae-haltigen Osteozyten zu sehen. Nach sechs Wochen beginnt der endgültige Umbau, so dass nach zwölf Wochen der neu ossifizierte Knochen von nativem Knochen nicht zu unterscheiden ist.

**[0185]** Die Ossifizierung in Gegenwart des PCA-Calciumphosphat ist im Allgemeinen daher also vollständig und scheint schneller abzulaufen als normales Knochenwachstum. Diese schnelle Rate der Ossifizierung legt nahe, dass das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat die Knochenheilung fördert. Neues Knochengewebe ist schon nach zwei Wochen zu sehen und kann den histologisch voll organisierten Zustand innerhalb von sechs Wochen, auf jeden Fall jedoch nach 3–6 Monaten erreichen. Bei segmentalen Bruchdefekten beim Schaf unter Verwendung von Implantaten mit bis zu 3 Gramm hydratisierten Precursor konnte Knochen mit 100% der Stärke eines Knochens ohne Fraktur innerhalb von drei Monaten festgestellt werden. In Gegenwart von trophischen Faktoren oder Wachstumsfaktoren, wie Knochenmorphogenese-Proteinen, kann dieser Prozess beschleunigt werden.

**[0186]** Zur Optimierung der Ossifizierung können gemäß bevorzugten Ausführungsformen die erfindungsgemäßen Vorrichtungen, Pasten und Kittmassen mit knochenbildenden Zellen angeimpft werden. Dies wird am einfachsten dadurch erreicht, indem die Vorrichtung (die das PCA-Calciumphosphat oder einen hydratisierten Precursor enthält) in Kontakt mit einer Quelle für körpereigene knochenbildende Zellen des Patienten gebracht wird. Solche Zellen liegen in knochenassoziiertem Blut oder Knochen-assoziierten Flüssigkeiten vor, z. B. auch exogenen Flüssigkeiten, die mit Knochen oder Knochenmaterialien oder Bereichen wie Periosteum, Rindenknochen, Knochenschwamm und Knochenmark in Kontakt waren. Sie liegen auch in Gewebe einschließlich Substantia compacta oder spongiosa, Knochenmark, Endosteum oder Periosteum vor. Im Falle von Vorrichtungen, wie Schrauben und Stiften, deren Einbringen in den Knochen mit Blutungen einhergeht, ist kein weiteres Animpfen erforderlich. Für Platten, die dem Kortikalknochen nur gegenüberliegen, ist zu empfehlen, periosteale Läsionen, die in Kontakt mit der Vorrichtung sind, vorzusehen. Es kann zweckmäßig sein, chirurgisch eine Auflage im Knochen herzustellen, indem ein Teil des Rindenknochens am Implantationsort entfernt wird. Es können auch andere Schritte unternommen werden, um die Ossifizierung zu verbessern, einschließlich dem Einbringen von knochenbildenden Zellen, die aus dem Patienten gewonnen wurden, in das Transplantat oder das Einbringen von trophischen Faktoren oder Knochenwachstum induzierenden Proteinen in die Vorrichtung oder auf die Vorrichtung. Nicht autologe Knochenzellen werden ebenfalls von der Erfindung umfasst, solange der gewünschte Grad der Knochenregeneration auftritt, bevor der Empfänger die knochenbildenden Zellen abstößt. Zellen oder Gewebe aus Primärquellen, Zelllinien oder Zellbanken können daher bei einigen Ausführungsformen ebenfalls zweckmäßig sein. Ähnliche Erwägungen treffen für die Knorpelbildung und die Heilung und das Animpfen des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat mit Chondrozyten und/oder anderen knorpelbildenden Zellen zu.

**[0187]** Das Implantat beugt auch schädlichen Reaktionen in der Knochenlücke vor. Beispielsweise bildet sich häufig fibröses Gewebe in Knochendefekten, was das Einwachsen des Knochengewebes beeinträchtigt. Das erfindungsgemäße Implantat ist biokompatibel und es hat sich erwiesen, dass es das Auftreten von Fibrosierung an Knochendefekten vermindert.

**[0188]** Das erfindungsgemäße orthopädische oder dentale Implantat kann einem Patienten in der Form einer Paste oder einer Kittmasse (d. h. als hydratisierter Precursor) implantiert werden. Da die erfindungsgemäße Reaktion, die zu dem PCA-Material führt, außerhalb des Körpers ausgelöst werden kann und bei Umgebungstemperatur langsam vonstatten geht, ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Material vor dem Aufbringen an dem

Ort des chirurgischen Eingriffs "abbündet" und unbrauchbar wird, sehr klein. Die Reaktion ist bei Körpertemperatur deutlich schneller und das Material härtet an Ort und Stelle. Diese Eigenschaft ist besonders zweckmäßig bei chirurgischen Eingriffen, weil dort eine maßgeschneiderte Anpassung der Vorrichtung an den Implantationsort in der Regel erforderlich ist. Das erfindungsgemäße orthopädische oder dentale Implantat kann alternativ hierzu auch außerhalb des Körpers vorgehärtet und später implantiert werden. Diese Vorgehensweise ist dann zweckmäßig, wenn maßgeschneiderte Formen nicht wesentlich sind und die Herstellung von einer großen Zahl von Implantaten gewünscht wird.

#### Applikation des Implantats am Knochen

**[0189]** Das erfindungsgemäße Implantat kann außerhalb des Körpers in einer Vielzahl von Formen hergestellt und unter Anwendung von für die Form des Implantats und die Art der Erkrankung geeigneten Verfahren an der Implantationsstelle in den Patienten eingebracht werden.

**[0190]** Nach einer Ausführungsform kann das Implantat als injizierbare Paste hergestellt werden. Zu den Precursoren in Pulverform wird eine Flüssigkeit gegeben, um einen injizierbaren hydratisierten Precursor zu bilden, der wie oben beschrieben in vivo in ein bioresorbierbares PCA-Calciumphosphat umgewandelt werden kann. Die genaue Menge der Flüssigkeit hängt von der gewünschten Konsistenz der Paste und der Art der pulverförmigen Precursor ab, die zur Herstellung des PCA-Materials verwendet werden. Typischerweise werden etwa 0,75–1,1 ml Flüssigkeit auf ein Gramm Pulver verwendet. Die Paste wird vorzugsweise an der Implantationsstelle mit Hilfe einer Spritze und vorzugsweise unter Verwendung einer Injektionsnadel Nr. 16 oder Nr. 18 injiziert.

**[0191]** Für einige Ausführungsformen kann es günstig sein, die Paste vorab herzustellen und die Paste bei Temperaturen unter Raumtemperatur bis zum Gebrauch in der Spritze aufzubewahren. Nach einigen Ausführungsformen kann die Injektion in eine Körperhöhle oder einen intermedullären Raum mithilfe einer Spritze durch die Anwendung von Vakuum unterstützt werden, um zur Bewegung von Fluiden oder Gasen beizutragen. Meistens kann ein Vakuum erzeugt werden, indem in der Nähe der geplanten Injektionsstelle eine zweite Nadel appliziert wird. Durch die zweite Nadel kann dann ein leichtes Vakuum erzeugt werden. Die Applikation des Implantats durch Injizieren ist besonders günstig, wenn das Material als Knochenzement verwendet wird, um Knochenfragmente zu verbinden und an Ort und Stelle zu halten oder die Haftung von beispielsweise Hüftprothesen zu verbessern. Ferner wird die Implantation in einer nicht offenen operativen Umgebung bevorzugt.

**[0192]** Nach einer anderen Ausführungsform kann das Implantat als formbare Kittmasse hergestellt werden. Zur Bildung eines hydratisierten kittartigen Precursors, der in vivo in ein bioresorbierbares PCA-Calciumphosphat umgewandelt werden kann, wird eine Flüssigkeit zu den pulverförmigen Precursoren gegeben. Die genaue Flüssigkeitsmenge hängt von der gewünschten Konsistenz der Kittmasse und der Art der pulverförmigen Precursor ab, die zur Herstellung des PCA-Materials verwendet werden. Es werden üblicherweise etwa 1,0 ml Flüssigkeit auf ein Gramm Pulver verwendet. Die hydratisierte Precursor-Kittmasse kann hergestellt und in etwa in der Form des Implantats modelliert werden. Die Kittmasse kann dann an die richtige Stelle eingepresst werden, um eine Lücke im Knochen, Zahnfach oder dergleichen zu füllen. Die Verwendung einer Knochenkittmasse ist besonders günstig, um Knochendefekte in nicht vereinigttem Knochen oder unter anderen Umständen zu beheben, bei denen die zu füllende Lücke groß ist und ein solcher Grad an mechanischer Integrität in dem Implantatmaterial erforderlich ist, dass sowohl die Lücke gefüllt als auch die Form beibehalten werden kann.

**[0193]** Nach einer weiteren Ausführungsform können trockene Precursorpulver direkt an einem Knochendefekt appliziert werden. Die Hydratisierung und Umwandlung des Precursors in das PCA-Material findet an der Stelle des Knochendefekts statt, wo er direkt Blut oder anderen physiologischen Flüssigkeiten ausgesetzt ist. Eine solche Applikation ist besonders günstig, wenn der Knochendefekt von übermäßigen Blutungen begleitet ist. Durch die hygroskopische Natur der pulverförmigen Precursor werden die Körperflüssigkeiten absorbiert, es entsteht eine physikalische Barriere zum Schutz der Wunde und es wird ein Knochenersatzmaterial bereitgestellt, das an der Stelle des Defekts das Knochenwachstum fördert.

**[0194]** Nach einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann das Implantat aus einem vorgehärteten PCA-Calciumphosphat hergestellt werden, das in der gewünschten Form modelliert wird. Hierzu kann ein hydratisierter Precursor als Kittmasse oder Paste, wie oben beschrieben, hergestellt, der hydratisierte Precursor in eine Form injiziert oder gepresst werden und das Precursormaterial sich in ein PCA-Calciumphosphat umwandeln und härten gelassen werden. Alternativ hierzu kann das PCA-Calciumphosphat als fester Block oder Block mit derartiger Geometrie hergestellt und unter Verwendung von Bohrwerkzeugen oder anderen im Stand



der Technik bekannten Formwerkzeugen in die gewünschte Form gebracht werden. Dieses Verfahren ist besonders günstig, wenn resorbierbare Gegenstände hergestellt werden sollen, beispielsweise Anker für Zahnimplantate, Spacer für die zervikale Fusion, resorbierbare Schrauben und Platten und langsam resorbierbare Körper für die Augmentationsplastik.

#### Orthopädische und dentale Implantate

**[0195]** Die hier beschriebenen Implantate sind für die Behandlung von zahlreichen orthopädischen und dentalen Erkrankungen zweckdienlich. Die für die Herstellung des Implantats verwendeten Stoffe sind vorzugsweise steril; sie können unter Anwendung von herkömmlichen Verfahren einschließlich Bestrahlung mit Gammastrahlung, Filtration und Ethylenoxid sterilisiert werden, wobei diese Aufzählung nicht einschränkend zu verstehen ist.

#### Heilung von Knochenfrakturen und Knochendefekten

**[0196]** Das PCA-Calciumphosphat kann dazu verwendet werden, zwei oder mehr Knochenteile miteinander zu verbinden und/oder die Heilung von Knochenfrakturen zu fördern, indem die durch die Fraktur gebildete Lücke oder der durch Druckbeanspruchung als Ergebnis der Fraktur gebildete Raum ausgefüllt wird.

**[0197]** Bei nicht vereinigten Knochenfrakturen kann das Implantat dazu verwendet werden, den Knochendefekt zu stabilisieren, da das Implantat in vivo an Ort und Stelle härtet. Das erfindungsgemäße Implantat ist besonders vorteilhaft, da die Knochenlücke ohne offenen operativen Eingriff gefüllt werden kann. Die Stelle des Knochendefekts kann hierzu durch Radiographie überwacht werden, um sicherzustellen, dass die Injektionsnadel exakt positioniert wird. Das Implantat kann dann direkt in den Knochendefekt injiziert werden. Zur Bestätigung der Platzierung kann die Stelle gewünschtenfalls mit Radiographie oder MRI sichtbar gemacht werden. **Fig. 19** zeigt in einer bildhaften Darstellung die Applikation des Implantats an einem Tibiadefekt, wobei das Implantatmaterial in den Knochendefekt injiziert wird. Wenn die Lücke besonders groß ist, kann es günstig sein, zunächst den Defekt zu immobilisieren oder "zu fixieren" und dann die Lücke mit dem Implantatmaterial zu füllen. Der Defekt kann unter Verwendung von herkömmlichen Fixiervorrichtungen fixiert werden, wie beispielsweise Schrauben, Stiften und Platten aus Titan. In bevorzugten Ausführungsformen wird der Defekt mit Schrauben oder Platten fixiert, die aus dem gehärteten PCA-Material und/oder Verbundmaterialien mit gehärtetem PCA-Material hergestellt sind, die selbst bioresorbierbar sind und somit ein vollständiges Einwachsen des Knochengewebes an der Stelle des Defekts ermöglichen und zum Entfernen der Materialien keinen postoperativen Eingriff erfordern.

**[0198]** Wenn der Knochen zersplittert oder fragmentiert ist, können die Knochenfragmente neu angeordnet und das Implantatmaterial dazu verwendet werden, sie an Ort und Stelle zu halten, solange an der Stelle der Fraktur die Knochenmatrix neu wächst. **Fig. 20** zeigt in einer bildhaften Darstellung einen fragmentierten Knochen, der neu zusammengesetzt wurde. Die hydratisierte Precursorpaste wird um die Knochenfragmente herum injiziert, die starr gehalten werden, sobald die Paste in ein PCA-Calciumphosphat umgewandelt ist. Der Knochen wächst wieder, das Knochengewebe wird regeneriert und die ursprünglichen Knochenfragmente werden in eine neue Knochenmatrix eingebettet.

**[0199]** Das Implantat kann auch dazu verwendet werden, Kompressionsbrüche zu heilen, wie Stauchungen der Tibia. Die kortikale Knochenoberfläche kann wieder ausgerichtet und unter Verwendung einer mechanischen Befestigung an Ort und Stelle fixiert werden und das Implantat kann dazu verwendet werden, die durch die kompressive Zerstörung des Knochens gebildete Lücke zu füllen.

**[0200]** Nach einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann das PCA-Calciumphosphatimplantat dazu verwendet werden, Stifte, Schrauben und weitere kompliziertere Prothesen zu befestigen, die dazu verwendet werden, den Knochen an Ort und Stelle zu halten. Durch Immobilisierung des Bruchs unter Verwendung von Materialien und Einbettung der Materialien in die PCA-Paste können mögliche Lücken gefüllt werden, wodurch die neue Knochenbildung um die Schraube beschleunigt werden kann. Außerdem verteilt das Implantat die Kraft der Schraube über eine größere Oberfläche, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Herausreißen oder der frühen Knochenresorption vermindert wird. Diese Vorgehensweise wird meistens gewählt, um gebrochene Hüftknochen wiederherzustellen, wenn eine Hüftprothese verwendet wird, den Schenkelhals des Femur zu verstärken, der das Gewicht trägt.

**[0201]** Wenn der operative Eingriff möglichst gering sein soll, wird das PCA-Material vorzugsweise als Paste verwendet und das Implantat wird mit Hilfe einer Spritze in den Knochendefekt eingebracht. Wenn ein minima-



ler Eingriff keinen Problempunkt darstellt, d. h. während einem offenen chirurgischen Eingriff, kann das Implantat als Kittmasse eingesetzt werden. In manchen Fällen ist dies tatsächlich vorzuziehen, da die zusätzliche Formbarkeit des PCA-Kittmaterials dem Arzt eine bessere Kontrolle über die endgültige Form des Implantats gibt und die Übereinstimmung des Implantats mit benachbarten Knochenoberflächen verbessert.

#### Behandlung von Osteoporose

**[0202]** Mit dem Altern verlieren die Knochen an Masse und werden dadurch poröser und spröder. Das PCA-Implantatmaterial kann dazu verwendet werden, Knochenwachstum zu fördern und den Knochen zu verdichten. **Fig. 21** umfasst eine bildhafte Darstellung eines normalen Knochens **60** mit einem gleichmäßigen und dichten Trabekelknochen-Netzwerk. In **Fig. 21** ist auch ein osteoporotischer Knochen **62** dargestellt, in dem die Knochenmasse in signifikanter Weise abgenommen hat. Der osteoporotische Knochen kann mit einem erfindungsgemäßen reossifizierenden PCA-Material behandelt werden, um den Knochen zu verdichten und vor Knochenfrakturen und Defekten zu schützen. Die Knochendichte kann verbessert werden, indem ins Innere des Knochens eine Paste aus hydratisiertem Precursor injiziert wird. Der Precursor dient in mehrfacher Weise dazu, den Knochen zu verbessern. Erstens härtet der hydratisierte Precursor zu einem PCA-Calciumphosphat aus, das stark ist und dazu dient, den bereits brüchig gewordenen Knochen zu verstärken. Zweitens stellt das PCA-Calciumphosphat eine biokompatible Matrix dar, in der ein neues Knochenwachstum stattfindet und die neues Knochenwachstum stimuliert, so dass ein neuer Knochen gebildet wird, der es ersetzt, wenn es biologisch abgebaut wird. Drittens ist das sich zersetzende PCA-Calciumphosphat eine bioverfügbare Calcium-Quelle für Osteoblasten und kann für die Bildung von neuem Knochen verwendet werden.

**[0203]** Das Implantat kann besonders wirksam sein, um den Kollaps von Vertebrae zu verhindern. **Fig. 22** zeigt in einer bildhaften Darstellung einen Wirbelsäulenbereich mit Wirbeln **70**, **71**, **72** und Bandscheiben **73**, **74**. Der Wirbel **70** ist gesund und zeigt eine dichte trabekuläre Knochenmatrix. Bei dem Wirbel **72** handelt es sich um einen osteoporotischen Wirbel, der aufgrund der erhöhten Porosität und verminderten Knochendichte zerquetscht wurde. Wirbel **71** ist ein osteoporotischer Wirbel, bei dem PCA-Calciumphosphat zur Festigung des Knochens und Regeneration der Knochenmasse implantiert wird.

#### Spinale und zervikale Fusion

**[0204]** Wenn Bandscheiben und Wirbelkörper zur Behandlung von degenerativen Erkrankungen, Traumata oder Tumoren entfernt werden müssen, müssen sie in der Regel durch ein strukturelles Transplantat ersetzt werden, um das zervikale Alignment des Patienten aufrechtzuerhalten. Das Knochen transplantat wird üblicherweise als Spacer zwischen den Wirbeln angebracht, um die Fusion der Wirbelkörper zu erleichtern und die Höhe wiederherzustellen. Herkömmliche Spacer, von denen einige als "Käfige" bekannt sind, bestehen aus Titan oder autologen oder allogenen Knochen transplantaten. Alle diese Vorrichtungen des Standes der Technik haben jedoch Nachteile. Autologe Knochen sind nicht immer verfügbar, bei allogenen Knochen besteht Infektionsgefahr und die Belastung durch Pathogene und Titan wird vom Körper nicht resorbiert und bleibt entweder im Körper oder muss chirurgisch entfernt werden.

**[0205]** Um diesen Nachteilen der Implantate des Standes der Technik abzuhelpen, kann PCA-Calciumphosphat als Spacer in Verfahren zur zervikalen Fusion eingesetzt werden. Das PCA-Calciumphosphat wird als Scheibe oder Abstandsstück gefertigt. Die PCA-Calciumphosphatscheibe kann als gehärteter, langsam resorbierbarer Spacer für die Fusion von aneinander angrenzenden Wirbeln verwendet werden. In bevorzugten Ausführungsformen liegt der Spacer in Form eines Hohlrings vor. Das Zentrum des Rings kann mit einem PCA-Calciumphosphat gefüllt sein, das so formuliert ist, dass es schnell bioresorbierbar ist und der Knochen einwächst.

**[0206]** Auch die spinale Fusion erfolgt über laterale Prozesse. Siehe beispielsweise Sandhu et al., Spine, Bd. 20: 2669–2682, 1995.

#### Prothesen

**[0207]** Prothesen zum Ersatz von Gelenken und insbesondere Hüftgelenksprothesen werden häufig eingesetzt und können die Lebensqualität von Patienten, die solche Prothesen erhalten, ganz wesentlich verbessern. Geläufige Einbettungstechniken sind jedoch ungeeignet, um jeglicher "Mikrobewegung" und Lücken zwischen der Prothese und dem natürlichen Knochen, der das Implantat erhält, vorzubeugen, so dass häufiger Lockerung auftritt und die Gelenkprothese im Laufe der Zeit ausfällt, was beim Patienten Schmerzen oder Beschwerden hervorruft.

**[0208]** Fig. 23 zeigt in einer bildhaften Darstellung eine Hüftgelenksprothese, die unter Verwendung von PCA-Calciumphosphat als Knochenzement fest in natürlichem Knochen verankert wird. Das Kugelgelenk und die Pfanne können im natürlichen Knochen in Aussparungen positioniert werden, die gebildet wurden, um diese aufzunehmen. Nach der Positionierung kann der hydratisierte Precursor um die Prothese herum injiziert werden, um die Lücken zwischen der Knochenwand und der Prothese zu füllen und die Prothese fest in dem patienteneigenen Knochen einzuzementieren. Alternativ kann die Knochenoberfläche mit dem hydratisierten Precursor beschichtet und die Prothese in dem mit dem PCA-Material beschichteten Knochen in Position gebracht werden. Der hydratisierte Precursor härtet und bindet ab und verankert dadurch die Prothese an der richtigen Stelle. In beiden Fällen wird das PCA-Material langsam bioresorbiert und durch natürlichen Knochen ersetzt; dadurch werden Lücken und Mikrobewegungen der Prothese minimiert.

**[0209]** Nach einer weiteren Ausführungsform kann die Prothese mit dem PCA-Material beschichtet werden. Der hydratisierte Precursor kann außerhalb des Körpers auf die Prothese aufgebracht werden, wo er härten kann und sich in PCA-Calciumphosphat umwandelt. Die Beschichtung erleichtert die Aufnahme der Prothese durch den Empfänger und fördert das Knochenwachstum an der Prothesenoberfläche.

**[0210]** Das vorliegende Implantatmaterial kann auch zur in vivo Behandlung von zuvor implantierten Prothesen verwendet werden, bei denen sich an der Grenzfläche von Prothese und Knochen Zysten gebildet haben. Die Zyste kann nach herkömmlichen Verfahren entfernt werden, diese Prozedur hinterlässt jedoch sehr häufig große Lücken angrenzend an die Prothese. Diese Lücken können durch Injizieren des erfindungsgemäßen Implantatmaterials in die Lücke gefüllt werden.

#### Ersatzmaterial für autologe Knochenimplantate

**[0211]** Aus verschiedenen Gründen wird das PCA-Material manchmal nicht bevorzugt als Implantat verwendet und der patienteneigene Knochen wird vorgezogen (beispielsweise autologes Knochengewebe, das aus dem Beckenkamm des Patienten gewonnen wird). Dies ist häufig bei der Behandlung von Knochenkrebs der Fall. Das PCA-Material kann jedoch an der Stelle, an der der Knochen entfernt wurde, verwendet werden, um an dieser Stelle schnell das Wiedereinwachsen des Knochens zu bewirken, um kosmetische Mängel zu vermeiden oder für die zukünftige Verwendung neuen Knochens zu bilden.

#### Rekonstruktive plastische Chirurgie

**[0212]** Unter Verwendung der hydratisierten Precursorpaste kann ein vorgehärtetes PCA-Calciumphosphat in der gewünschten Form angebracht werden. Alternativ hierzu kann eine hydratisierte Precursorpaste hergestellt und in vivo geformt und unter Verwendung der hydratisierten Precursorpaste an der Stelle befestigt werden. Wo synthetische Knochentransplantate medizinisch ungeeignet sind, kann der patienteneigene Knochen gewonnen und an der Implantationsstelle unter Verwendung der hydratisierten Precursorpaste oder der Kittmasse befestigt werden. Wie oben beschrieben, wandelt sich der Precursor in das PCA-Calciumphosphat um, das allmählich resorbiert wird und neues Knochenwachstum an der Implantationsstelle fördert, wobei nach einer bevorzugten Ausführungsform vor dem Verschließen vorhandenes Periosteum über die Implantatoberfläche gezogen wird.

#### Parodontale Defekte

**[0213]** PCA-Calciumphosphat kann in Zahnfächern als Implantat verwendet werden, um die mit einer Zahnextraktion verbundenen Probleme zu vermeiden, wie Alveolitis, Infektion und fibröses Wachstum. Fig. 24 zeigt in einer bildhaften Darstellung eine Zahnalveole, in die ein Implantat injiziert wird. Das Implantat wandelt sich in PCA-Calciumphosphat um und wird innerhalb von sechs Monaten, vorzugsweise innerhalb von sechs Wochen und idealerweise schon nach drei Wochen durch neuen Knochen ersetzt. Der neue Knochen liefert eine bessere Oberfläche, in die die Dentalprothese (Ersatzzahn) implantiert werden kann.

#### Defekte des Alveolarkamms

**[0214]** Wenn durch Traumata, kongenitale Missbildungen oder Erkrankungen Knochenverluste in dem Kieferbereich auftreten, der die Zahnfächer aufweist (Alveolarkamm), kann die Wiederherstellung des Alveolarkamms erforderlich sein, bevor eine Dentalprothese implantiert werden kann. Die Handhabung von Alveolarkammdefekten ist schwierig, da das Ausmaß der Knochendefekte oft größer ist als der durch Zahnextraktion entstehende Knochendefekt und kann den Ersatz (oder das Einwachsen) einer beträchtlichen Menge von Knochengewebe erfordern.

**[0215]** Das herkömmliche Verfahren kann eine Nasenbodenanhebung, Knochentransplantation und Knochenregeneration erforderlich machen. Knochenbildung vor der Implantation der Dentalprothese hat den Vorteil, dass für die Implantation eine größere Knochenmasse zur Verfügung steht und daher das Alignment und die Festigkeit des Implantats verbessert wird. Dieser Prozess wird üblicherweise jedoch schrittweise durchgeführt, da herkömmliche Knochenregenerierung lange dauert, damit ein Knochen mit ausreichender Festigkeit für das Knochenimplantat gebildet wird. Ein zweistufiges Verfahren hat daher den Nachteil einer langen Heilungszeit, bevor das Implantat angebracht werden kann (ca. neun Monate), und einer minderen Knochenqualität des regenerierten Gewebes. Siehe C. M. Misch und C. E. Misch in *Implant Dentistry* 4 (4): 261 (1995).

**[0216]** Durch das erfindungsgemäße Implantat kann der Aufbau des Alveolarkamms und die Dentalimplantation nach wesentlich kürzerer Zeit und häufig in nur einem Schritt erfolgen. Das Implantat wird als Paste oder Kittmasse in den Alveolarkamm eingebracht, wo es abbindet und in situ härtet. Nach Stunden oder sogar Minuten ist das Implantat ausreichend hart, damit es das Zahnimplantat aufnehmen kann. Nach sechs Monaten regeneriert das Implantat allmählich natürlichen Knochen, wodurch das Zahnimplantat in einen harten Knochen eingebunden wird. Die Kammvergrößerung und Implantation der Dentalprothese kann daher gleichzeitig oder innerhalb von einigen Tagen erfolgen. Das Dentalimplantat kann auch vor der Härtung in den hydratisierten Precursor eingebracht werden. Das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat kann außerdem in Verbindung mit herkömmlichen Verfahren in das Implantat injiziert werden, um das Einwachsen des Knochens in das Dentalimplantat und um das Dentalimplantat herum zu verbessern.

**[0217]** In gleicher Weise kann das erfindungsgemäße Implantat verwendet werden, um den Kamm entlang der Nasenhöhle zu vergrößern, wenn der natürliche Knochen zu dünn ist, um die Prothese aufzunehmen. Wie in Fig. 25 bildhaft gezeigt ist, kann daher angrenzend an die Sinushöhle in den Alveolarkamm ein Loch gebohrt werden, die Sinushöhle kann gehoben und das Implantatmaterial an der Stelle injiziert und härten gelassen werden. Nach dem Härten und der Ossifizierung kann an dem Kamm die Implantation der Zahnprothese erfolgen.

#### Verwendung als Hämostatikum

**[0218]** Das trockene Precursorpulver kann auch in trockener Form als hämostatisches oder absorptives Mittel verwendet werden. In Kontakt mit Körperflüssigkeiten wird das Material hydratisiert und härtet dann an der Stelle ähnlich wie der ex vivo hergestellte hydratisierte Precursor. Diese Eigenschaft ist besonders günstig, um sowohl in harten als auch weichen Geweben Blutungen zu kontrollieren. In einer Anwendung wird das Material nach Spinalpunktion oder einem spinalen chirurgischen Eingriff in die Öffnung gebracht, um ein Patch zu bilden und CSF-Verluste zu verhindern.

#### Kraniale RepARATION

**[0219]** Wegen der langsamen Heilung des Knochens bei rekonstruktiven chirurgischen Eingriffen am Cranium ist die kraniale RepARATION besonders problematisch. Das erfindungsgemäße PCA-Material kann sowohl zur RepARATION als auch zur Stimulierung des Wachstums des Schädelknochens verwendet werden. Außerdem können Wachstumsfaktoren oder osteogene Zellen in das Implantat aufgenommen werden, um die Heilung noch weiter zu stimulieren.

#### Knorpelwachstum

**[0220]** Implantate aus PCA-Calciumphosphat können verwendet werden, um das Wachstum von neuem Knorpelgewebe zu fördern. Knorpelbildende Zellen (beispielsweise primäre Chondrozyten oder Chondrozytenzelllinien) können als Implantat verwendet werden. Das Implantat bietet eine Matrix für Zellwachstum und Proliferation und dient zum Verbinden mit anderen Gewebeoberflächen (beispielsweise Knochen oder Knorpel).

**[0221]** Hierfür wird die Knorpelhaut zerrissen und das PCA-Calciumphosphat wird in den Knorpel injiziert. Das PCA-Material enthält vorteilhaft Chondrozyten, die das Knorpelwachstum fördern. Für weitere Informationen zum Animpfen einer Gewebematrix mit Zellen, siehe "Cell Seeding of Ceramic Compositions", U.S.S.N. 08/729,354.

#### Knochendistraktion

**[0222]** Das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat kann in einem als Knochendistraktion bekannten Ver-

fahren eingesetzt werden. Die Knochendistraktion ist eine orthopädische Operation, die letztlich den Knochen streckt. In diesem Verfahren wird der Knochen durchtrennt und unter Verwendung von orthopädischen Klammern allmählich auseinandergezogen. Das PCA-Material kann transdermal injiziert oder chirurgisch implantiert werden, um die durch die Ausdehnung des Knochens gebildete Knochenlücke zu füllen. Das PCA-Calciumphosphat fördert bei Verwendung in dieser Applikation das Knochenwachstum und die Reparatur. Da das PCA-Material sowohl als Gerüst als auch als Calciumquelle dient, kann die Distraktionsrate im Vergleich mit früheren Verfahren deutlich erhöht werden. Unter Anwendung derzeitiger Verfahren ist die maximale Distraktionsrate auf etwa 1 mm pro Tag beschränkt. Unter Verwendung von PCA-Phosphat kann die Distraktionsrate erhöht werden und in manchen Fällen bis zu 2–5 mm pro Tag betragen.

#### Temporäre Knochenstrukturen

**[0223]** Das erfindungsgemäße Implantat kann im Körper an Stellen verwendet werden, die keine Knochenstrukturen sind. Es kann beispielsweise ein Implantat aus PCA-Calciumphosphat hergestellt und als Schutzstruktur für verschiedene Körperorgane verwendet werden. Das PCA-Material kann erfindungsgemäß als Träger, Abschirmung oder Gerüst für empfindliche Organe verwendet werden. Das PCA-Material kann beispielsweise außerhalb des Körpers als gehärteter vaskulärer Stent bei der Behandlung von Herzerkrankungen oder als gastrointestinaler Stent für die Behandlung der Krone-Erkrankung verwendet werden. Das Implantat kann alternativ verwendet werden, um einen vorübergehenden Träger für genähte oder geklammerte Reparaturen, Bypässe oder Organ- oder Gewebetransplantate und -implantate zu bilden. Der hydratisierte Precursor kann um die Struktur, die Stützung benötigt, herum angebracht werden, wo er härtet und bis zum Auftreten der Resorption als Träger oder mechanischer Schutz dient.

**[0224]** Die resorbierbare Natur des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat und seine Fähigkeit zur benignen Wechselwirkung mit und Absorption von Proteinen, Nucleinsäuren und anderen Substanzen macht es zu einer idealen Substanz für die Verwendung als implantierbares Depot für die Abgabe von therapeutischen Substanzen an den Körper. Es ist im Allgemeinen vor allem erforderlich, dass der Wirkstoff, der abgegeben werden soll, in Gegenwart des Vehikels während der Herstellung und/oder Zufuhr wirksam bleibt oder im Anschluss daran aktiviert oder reaktiviert werden kann. Die Stabilität und/oder Kompatibilität eines speziellen Wirkstoffs mit dem erfindungsgemäßen Material sowie Strategien für die Herstellung können in vitro empirisch getestet werden. Einige repräsentative Klassen für zweckmäßige biologische Wirkstoffe umfassen organische Moleküle, Proteine, Peptide, Nucleinsäuren, Nucleoproteine, Polysaccharide, Glykoproteine, Lipoproteine und synthetisch und biologisch gestaltete Analoga dieser Verbindungen.

**[0225]** Nach einem Aspekt der Erfindung werden knochenregenerierende Proteine (BRP, bone regenerative proteins) in das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat eingebracht. Es konnte gezeigt werden, dass BRPs die Wachstumsrate des Knochengewebes erhöhen und die Heilung des Knochens beschleunigen. Ein Knochentransplantat mit erfindungsgemäßigem PCA-Calciumphosphat und BRP wird die Knochenheilung sogar schneller fördern als ein Knochentransplantat unter Verwendung des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat alleine. Die Wirksamkeit der BRP wird noch weiter verbessert, wenn die Resorption des PCA-Calciumphosphat so geregelt wird, dass es sich mit einer Rate auflöst, die BRP, Calcium und Phosphor mit der optimalen Dosierung für das Knochenwachstum liefert. Ein solches Verfahren zum Einbringen von BRP umfasst, ist jedoch nicht darauf beschränkt, das Vermischen einer Pufferlösung, die BRP enthält, bei einem optimalen pH-Wert, der die Proteinaktivität aufrechterhält, anstelle von destilliertem Wasser. Beispiele für BRPs umfassen, sind jedoch nicht darauf beschränkt, den transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$ , Zell-Attachment-Faktoren, Endothelzellen-Wachstumsfaktoren und Knochenmorphogenese-Proteine. Derartige BRPs werden derzeit von Genetics Institute Cambridge, MA; Genentech, Palo Alto, CA; und Creative Biomolecules, Hopkinton, MA, entwickelt.

**[0226]** In anderen erfindungsgemäßen Ausführungsformen wird in Erwägung gezogen, Antibiotika oder andere Wirkstoffe in das amorphe Calciumphosphat und seine Gemische einzubringen. Unter klinischen Gesichtspunkten ist eines der Haupterfordernisse bei chirurgischen Knochentransplantationen die Kontrolle der postoperativen Entzündungen oder Infektionen. Ein Knochentransplantat, das das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat und ein oder mehrere Antibiotika enthält, soll die Gefahr für lokale Infektionen in dem Operationsgebiet mindern und so zu einer infektionsfreien und damit schnelleren Knochenheilung beitragen. Die Wirksamkeit von Antibiotika wird weiter erhöht, wenn ihre Freisetzung aus dem PCA-Abgabesystem eingestellt wird, und die Resorptionsrate so ist, dass es sich mit einer Rate auflöst, die die antibiotischen Peptide oder ihre aktiven Komponenten mit der effektivsten Dosierung an der Stelle der Gewebereparatur freisetzt. Beispiele für Antibiotika umfassen (sind jedoch nicht darauf beschränkt) Penicillin, Chlortetracyclin-Hydrochlorid (Aureomycin), Chloramphenicol und Oxytetracyclin (Terramycin). Sowohl Antibiotika, meistens Polypeptide,

als auch knochenregenerierende Proteine, können mit dem erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat vermischt werden, um alle oder die notwendigsten Komponenten lokal abzugeben, die zu optimalen Bedingungen für die Reparatur des Knochengewebes führen.

**[0227]** Nicht resorbierbare apatitische Knochenfüllmaterialien und Zemente können ebenfalls nach den Verfahren der vorliegenden Erfindung hergestellt werden, indem die Umwandlung von ACP in einen kristallinen Zustand als bei PCA-Calciumphosphat gefördert wird. Im Allgemeinen wird durch die Verwendung von mehr Hydroxyapatit stöchiometrischen Ca/P-Verhältnissen, verminderte Verwendung von Kristallisationsinhibitoren und Bedingungen, die die Kristallisierung fördern, wie höhere Temperaturen, die Umwandlung in Richtung eines kristallinen Produktes verschoben.

#### Feste PCA-Calciumphosphatvorrichtungen

**[0228]** Für andere erfindungsgemäße Applikatoren werden feste PCA-Calciumphosphat-Zusammensetzungen entweder in vivo oder ex vivo hergestellt. Das erste Verfahren zur Herstellung eines Feststoffs besteht darin, die unumgesetzten Precursoren des PCA-Materials zu komprimieren. ACP wandelt sich in PCA-Calciumphosphat um, sobald der Pressling einer wässrigen Umgebung ausgesetzt wird (beispielsweise in vivo Implantation). Das zweite Herstellungsverfahren umfasst das Komprimieren von bereits umgewandelten PCA-Körnchen in die gewünschte Form. Das Material kann auch nach beliebigen anderen Verfahren zur Herstellung von Presslingen, die in der pharmazeutischen Industrie bekannt sind, gebildet werden. Nachdem die Form hergestellt ist, kann sie folgendermaßen modifiziert werden: Das geformte Material kann beschichtet werden. Therapeutische Substanzen können auf dem festen Material absorbiert werden. Die Form und Textur des Presslings können weiter modifiziert werden. Es können sterile Pellets hergestellt werden, indem vorsterilisierte Komponenten verwendet werden oder die Pellets am Ende sterilisiert werden. Alle Veränderungen des festen PCA-Calciumphosphat werden von der vorliegenden Erfindung umfasst.

#### Verfahren zur Herstellung von Pellets

**[0229]** Gemäß einer Ausführungsform führt das Komprimieren der nicht umgesetzten Precursoren des PCA-Materials zu den vorgehärteten Pellets. Die erste Komponente ist ein amorphes Calciumphosphat, die zweite Komponente ist der Promotor. Der bevorzugte Promotor ist das Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD). Der Promotor kann auch ein anderes Calciumphosphat sein, wie kristallines HA. Die beiden Komponenten werden komprimiert und durch ein geeignetes Verfahren in die gewünschte Form gebracht. Bevorzugte Ausführungsformen für das Komprimieren und Formen schließen Handpressen oder hydraulische Pressen, wie in den Beispielen 32 und 33 beschrieben, ein. Der Druck beim Komprimieren hängt davon ab, welche Eigenschaften für den Pressling gewünscht werden. Ein niedriger Druck ist beispielsweise für einen Pressling zweckmäßig, der schnell resorbiert werden soll. Weitere Verfahren zur Herstellung von Pellets, die in der pharmazeutischen Industrie bekannt sind, sind ebenfalls akzeptabel. Der komprimierte Gegenstand mit der gewünschten Form reagiert vorzugsweise endotherm bei 37°C in vivo unter Bildung des PCA-Calciumphosphat. Die Umwandlung von ACP in Gegenwart eines Promotors tritt unter diesen Bedingungen während der Bildungsreaktion des PCA-Calciumphosphat auf.

**[0230]** Gemäß einer anderen Ausführungsform wird das PCA-Calciumphosphat in vitro gebildet. Ein amorphes Calciumphosphat wird in Gegenwart eines Promotors und eines begrenzten Volumens eines wässrigen Mediums in wenigkristallines apatitisches Calciumphosphat umgewandelt. In der Ausführungsform, die besonders bevorzugt wird, wird das PCA-Material bei 37°C gehärtet. Wenn das PCA-Material fest ist, wird es lyophilisiert. Das trockene Material wird dann während einer vorgegebenen Zeitspanne in einer Zerkleinerungskammer zermahlen. Andere Verfahren zum Zermahlen, wie mit Mörser und Stößel, sind ebenfalls durchführbar. Dann wird das Pulver unter Anwendung der oben beschriebenen Verfahren zu einem Pellet geformt oder in eine andere gewünschte Form gebracht.

**[0231]** Das PCA-Material kann außerdem hergestellt werden, indem ein amorphes Calciumphosphat mit einem Promotor und einem biologisch geeigneten wässrigen Medium zusammengebracht wird. Dann wird das PCA-Material mit der Konsistenz einer Paste oder Kittmasse nach einem beliebigen geeigneten Verfahren in die gewünschte Form gebracht. Nach dem Formen des Materials wird es anschließend besonders bevorzugt bei 37°C gehärtet. Ein Temperaturbereich über oder unter 37°C ist ebenfalls akzeptabel. Wenn das geformte Objekt fest geworden ist, wird es lyophilisiert. Der Gegenstand wird gefriergetrocknet, da die Gegenwart von Wasser in dem Pellet dazu führen kann, dass das Material instabiler wird und dazu neigt, kristalliner zu werden.

**[0232]** Wenn das PCA-Material gebildet ist, wird es geformt und gehärtet und anschließend lyophilisiert, wie

dies oben beschrieben wurde. Es kann zuweilen instabil sein und dazu neigen, kristalliner zu werden und gegebenenfalls Hydroxyapatit zu bilden. Das hergestellte feste PCA-Calciumphosphat kann entweder trocken oder nass aufbewahrt werden. Stabilitätsfragen bezüglich der Aufbewahrung des PCA-Materials umfassen Temperatur, Lyophilisierung, die Verwendung von Inhibitoren und, ob das Material trocken oder nass ist. Die Lyophilisation verbessert die Stabilität des PCA-Materials, da die Gegenwart von Wasser die Umwandlung verursacht. Niedrigere Temperaturen machen das PCA-Material im Vergleich mit der Stabilität bei Raumtemperatur oder in vivo stabiler. Ideale Bedingungen umfassen das trockene Aufbewahren der Pellets bei Raumtemperatur, ohne dass sie Feuchtigkeit ausgesetzt sind. Das PCA-Material kann auch in einem wässrigen Medium bis zu 30 Tage bei Umgebungstemperatur und pH 7 aufbewahrt werden. Es können an dem PCA-Material FTIR- und XRD-Analysen durchgeführt werden, um die Stabilität des PCA-Materials während der Aufbewahrung zu überwachen. Die Peaks bei  $563\text{ cm}^{-1}$ ,  $1034\text{ cm}^{-1}$ ,  $1638\text{ cm}^{-1}$  und  $3432\text{ cm}^{-1}$  (FTIR) sollten sich nicht verändern.

#### Medizinische Verwendung der Pellets

**[0233]** Das feste PCA-Calciumphosphatmaterial kann in vielen verschiedenen Anwendungen eingesetzt werden, wobei die Details von den jeweiligen Umständen abhängen. Eine erste Anwendung bezieht sich auf orthopädische Implantate. Pellets, Platten, Schrauben, Granulat, Füllmaterial für Knochenlücken und andere Formen sind für orthopädische Anwendungen geeignet. Die Pellets, Platten und Schrauben können verschiedenste Formen und Größen aufweisen.

**[0234]** Füllmaterial für Knochenlücken wird behutsam in die in dem Knochen vorhandenen Lücken eingebracht, bei denen es sich um chirurgisch gebildete Defekte oder Defekte handelt, die von traumatischen Verletzungen, Tumoren und anderen Erkrankungen stammen. Sandkornartiges Granulat (1–2 mm) des PCA-Calciumphosphat kann auch in Hartgewebe eingesetzt werden. Das Granulat ist besonders zweckmäßig bei der Alveolarkammreparation und Haarbrüchen. Andere Applikationen umfassen jedoch beispielsweise auch tibiale Frakturen, Maxillo- und kraniale Indikationen, Extraktionslücken und spätere Spinalfusion. Ein signifikanter Vorteil des Granulats besteht darin, dass es so angeordnet werden kann, dass es in schmale Bereiche passt, in denen Knochenregeneration erforderlich ist. Das sandkorngroße Granulat kann auch verwendet werden, um Prothesen zu verankern, da es in die Bereiche rutschen und sich in den Bereichen absetzen kann, wo es implantiert wurde, und kann dazu dienen, die verschiedenen medizinischen Vorrichtungen an ihren korrekten Lagen zu halten. Die Pellets können für Implantationszwecke außerdem mit der PCA-Paste vermischt werden. Durch die Verwendung dieser festen resorbierbaren Implantate sind außerdem metallische Implantate im Körper überflüssig.

**[0235]** Eine zweite Anwendung für festes PCA-Calciumphosphat besteht darin, eine Trägermatrix für lebendes Gewebe zu bilden. Diese Matrizen können verwendet werden, um Zellwachstum, Zelltransplantate und Zelltherapie zu unterstützen. Wenn geeignete Zellen auf die Trägermatrix aus vorgehärtetem PCA-Material aufgebracht werden, werden die Zellen in effizienter Weise zu der gewünschten Implantationsstelle gebracht. Das PCA kann in vitro oder in vivo mit den Zellen beimpft werden, in Abhängigkeit davon, welche Vorgehensweise für die jeweilige Indikation geeignet ist. Die Verwendung von lebenden Zellen im Körper fördert die Selbstheilung durch Geweberegeneration.

**[0236]** Die Porosität der festen PCA-Implantate ist ein wesentlicher Aspekt für das Einwandern der Zellen zur Regeneration von Knochengewebe. Da die Trägermatrix aus PCA-Material besteht, wird sie im Körper vollständig resorbiert, d. h. die implantierte Matrix initiiert Zellwachstum, während sie resorbiert wird.

**[0237]** Eine dritte Anwendung für das feste PCA-Material ist ein Abgabesystem. Festes PCA-Calciumphosphat kann in Kombination mit Antibiotika, Impfstoffen, Knochenmorphogenese-Proteinen und anderen medizinisch zweckmäßigen Substanzen eingesetzt werden. Jeder biologische Wirkstoff kann bei der Herstellung in der Precursorphase gegeben oder nach der Umwandlung hinzugefügt werden. Die Pellets können auch eingetaucht oder in einer anderen Weise mit dem abzugebenden Wirkstoff beschichtet werden.

#### Verschiedene Verwendungen

**[0238]** Das vorgehärtete PCA-Calciumphosphat kann verändert werden und so zu Variationen eines Knochenersatzmaterials führen. Die erste Alternative besteht darin, das PCA-Material in einem Verbundmaterial zu verwenden. Substanzen wie Binder, Polymere, Füllstoffe und Beschichtungen und andere Substanzen werden zu dem PCA-Material gegeben, um die physikalischen und/oder mechanischen Eigenschaften des Materials zu verändern. Binder und Polymere werden zu dem PCA-Material gegeben, um seine mechanischen und

resorptiven Eigenschaften zu verändern. Durch Füllstoffe kann das PCA-Calciumphosphat unter Anwendung von geringeren Komprimierungskräften in Form von Pellets gebracht werden. Bindemittel und Füllstoffe geben dem PCA-Material Festigkeit, Masse und Adhäsion. Nach Einarbeiten eines Füllstoffs oder Bindemittels kann es überflüssig sein, das Material in Pelletform zu verdichten, da der Füllstoff oder das Bindemittel zur Bildung einer festen Matrix als ausreichendes Gerüst dienen können. Beschichtungen auf dem PCA-Material stellen einen Puffer für das Material dar und schützen die innere Oberfläche vor Feuchtigkeit, die gegebenenfalls zu einer Umwandlung des ACP in PCA führen würde.

**[0239]** Gemäß der bevorzugten Ausführungsform werden die PCA-Materialien nach Implantation durch Knochengewebe ersetzt. Der Ersatz von festem PCA durch von Knochengewebe verschiedene Gewebe kann durch Animpfen des PCA mit Stammzellen oder kommitierte Stammzellen oder Precursoren für andere Gewebe, wie Knorpel, induziert werden. Die Charakteristika des Implantatortes beeinflussen ebenfalls den Gewebeersatz (beispielsweise führt verminderter Sauerstoff zu Knorpelbildung).

**[0240]** Ein dritte alternative Variante bei der Herstellungsmethode des PCA-Calciumphosphat besteht in der Abänderung des Promotors. Der Promotor übernimmt in Abhängigkeit von dem gewünschten Ergebnis verschiedene Aufgaben.

**[0241]** Die Erfindung wird in Bezug auf die folgenden Beispiele näher erläutert, die nur zur Erläuterung angegeben sind und die Erfindung keinesfalls einschränken.

#### Beispiel 1

**[0242]** Herstellung von PCA-Calciumphosphat unter Verwendung von ACP und teilnehmenden Promotoren. Dieses Beispiel zeigt die Härtungseigenschaften und die Bildung von PCA-Calciumphosphat aus ACP unter Verwendung von mehreren verschiedenen teilnehmenden Promotoren. Das hochreaktive ACP wird gemäß Beispiel 5 hergestellt.

**[0243]** Die nanokristallinen Hydroxyapatite der Proben 1-1, 1-2 und 1-3 wurden ohne Kristallisationsinhibitoren folgendermaßen hergestellt: 218 g Dinatriumhydrogenorthophosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) werden in 1200 ml destilliertem Wasser gelöst. Für das Carbonat-haltige PCA-Calciumphosphat der Proben 1-1 und 1-2 werden 80 g  $\text{NaHCO}_3$  zu der Lösung gegeben. 70 g Calciumnitrat [ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ] werden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Calciumlösung wird bei Raumtemperatur unter beständigem Rühren schnell in die Phosphatlösung gegossen. Der Niederschlag tritt sofort auf und ist im Wesentlichen vollständig. Der pH-Wert des Niederschlags wird durch Zusatz einer Natriumhydroxidlösung auf 7,4 eingestellt, um die Bildung von sauren Calciumphosphaten zu verhindern. Der Niederschlag wird sofort durch Filtrieren durch ein Buchner-Filter (mit einer Gesamtoberfläche von etwa  $0,1 \text{ m}^2$ ) abgetrennt und mit etwa 3 Litern destilliertem Wasser gewaschen. Auf dem Filterpapier wird ein gelartiger Kuchen von niedrigkristallinem Calciumphosphat erhalten. Ein Teil des gelartigen Kuchens wird für die Proben 1-2 und 1-3 unmittelbar lyophilisiert.

**[0244]** Für die Probe 1-1 wird der gelartige Kuchen folgendermaßen behandelt: Nach Filtration und Waschen wird zu dem gelförmigen Niederschlag eine geeignete Menge destilliertes Wasser (5–80 Gew.-%) gegeben. Das Gel wird homogenisiert, indem es einige Minuten kräftig geschlagen wird. Dann wird es in Polytetrafluorethylen (PTFE)-Formen (Durchmesser 60 mm; Höhe 2 mm) eingegossen und einige Minuten mit Ultraschall behandelt, um die in dem Gel eingeschlossenen Luftblasen zu entfernen.

**[0245]** Die Formen werden in einer Kammer bei kontrollierter Temperatur (5 bis  $37^\circ\text{C}$ ) und kontrollierter Feuchtigkeit (10 bis 95% RH) getrocknet. Die Proben schrumpfen beim Trocknen langsam und setzen das meiste Wasser frei. Die Rate für das Trocknen und Schrumpfen der Proben hängt von dem anfänglichen Wassergehalt ab. Das Material härtet beim Trocknen und wird glasig. Es enthält etwa 10% Restwasser.

**[0246]** Die weiteren Hydroxyapatite und Calciumquellen stammen aus kommerziellen Quellen.



Tabelle 1  
ACP-Umwandlung unter Verwendung von teilnehmenden Promotoren

Probe	teilnehmender Promotor	Inkubation bei 37 °C	Grad der Härtung	PCA* mit FTIR	PCA* mit XRD
1-1	Carbonat-haltiger nanokristalliner Hydroxyapatit, luftgetrocknet	30 Min. 2 h	beginnendes Abbinden hart	ja	ND
1-2	Carbonat-haltiger nanokristalliner Hydroxyapatit, gefriergetrocknet	30 Min. 2 h	hart hart	ja	ja
1-3	nicht Carbonat-haltiger nanokristalliner Hydroxyapatit, gefriergetrocknet	30 Min. 2 h	beginnendes Abbinden hart	ja	ND
1-4	Hydroxyapatit Aldrich, Korngröße >15-30 µm	30 Min.	hart	ja	ja
1-5	Hydroxyapatit Clarkson, Korngröße >250 µm	30 Min.	beginnendes Abbinden	ja	ND
1-6	Monetit – nicht calcinierte Korngröße	30 Min. 15 h	weich beginnendes Abbinden	ja	ND
1-7	CaCO <sub>3</sub>	30 Min. 15 h	beginnendes Abbinden	ja	ND
1-8	Ca(OH) <sub>2</sub>	30 Min. 15 h	weich beginnendes Abbinden	ja und Ca(OH) <sub>2</sub>	ND
1-9	Ca(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	30 Min. 15 h	weich weich	ja	ND

\*PCA wenigkristallines apatitisches Calciumphosphat

ND Analyse nicht durchgeführt

**[0247]** Das ACP wurde mit dem jeweiligen Promotor in einem Verhältnis (wt/wt) von etwa 50 : 50 (siehe Tabelle 1) 5 Minuten in einer SPEX-Labormühle vermischt. Es wurden etwa 0,8 ml H<sub>2</sub>O/g trockene Pulver zu dem trockenen Precursorgemisch gegeben und zu einer Paste vermischt. Das Gemisch wurde dann zu einem Ball geformt, in einem feuchten Papier eingewickelt und mindestens 30 min auf 37°C erwärmt. Nach 30 Minuten und zu verschiedenen Zeitpunkten danach wurde die Paste auf ihre Härte überprüft. Die **Fig. 14** und **Fig. 15** sind repräsentative XRD-Ergebnisse für die Reaktionen 1-2 und 1-4. Die Verwendung von Hydroxyapatiten mit zwei verschiedenen Korngrößen als teilnehmende Promotoren führte zu ähnlichen Ergebnissen wie die Verwendung von DCPDs mit unterschiedlicher Korngröße (siehe Beispiel 10). Das bedeutet, dass der Hydroxyapatit mit größerer Korngröße langsamer und weniger vollständig härtet als der Hydroxyapatit mit kleinerer Korngröße.

#### Beispiel 2

**[0248]** Dieses Beispiel zeigt die Verwendung von neutralem apatitischem Calciumphosphat als Promotor für die Umwandlung von ACP in das erfindungsgemäße Calciumphosphat zur Förderung von Knochenwachstum in vivo. Stöchiometrischer Hydroxyapatit wird mit reaktivem ACP, wie in Beispiel 1-4 beschrieben, vermischt. Die hydratisierte Precursorpaste wird, wie in den Beispielen 15, 16 oder 19 beschrieben, bei Tieren angewandt. Die Heilung des Knochens und die Biokompatibilität wird wie beschrieben zu den angegebenen Zeitpunkten überwacht.

#### Beispiel 3

**[0249]** Dieses Beispiel zeigt die Bildung von PCA-Calciumphosphat, ausgehend von ACP, unter Verwendung mehrerer verschiedener passiver Promotoren.

**[0250]** Das hoch reaktive ACP wird gemäß Beispiel 5 hergestellt. Das ACP wird mit dem jeweiligen Promotor in einem Verhältnis (wt/wt) von etwa 5 : 1 oder 1 : 1 (siehe Tabelle 2) 5 Minuten in einer SPEX-Labormühle vermischt. Wasser (0,75–0,85 ml) wird hinzugefügt und es wird vermischt, um eine Kittmasse zu bilden. Das Gemisch wird dann zu einem Ball geformt, mit einem feuchten Seidenpapier umwickelt und mindestens 30 min auf 37°C erwärmt. Nach 30 Minuten und zu verschiedenen Zeitpunkten danach wird die Paste auf ihre Härte untersucht. **Fig. 13** ist eine repräsentative XRD-Messung von Beispiel 2-4 unter Verwendung eines Aluminiumoxidpromotors. In dieser Figur sind die Aluminiumoxidpeaks zu sehen, die das Standard-PCA-Calciumphosphat-Profil überlagern.

Tabelle 2  
ACP-Umwandlung unter Verwendung von passiven Promotoren

Untersuchung #	Passiver Promotor (ACP:Promotor)	Inkubationszeit bei 37 °C	Grad der Härtung	PCA* mit FTIR	PCA* mit XRD
2-1	SiO <sub>2</sub> (5:1)	30 Min. 3 h	weich sehr hart	ja	ja
2-2	Glimmer (5:1)	30 Min. 12 h	weich sehr hart	ja	ja
2-3	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (1:1)	30 Min. 12 h	weich sehr hart	ja	ja
2-4	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (5:1)	30 Min. 12 h	weich sehr hart	ja	ja

\*PCA wenigkristallines apatitisches Calciumphosphat

#### Beispiel 4

**[0251]** Dieses Beispiel zeigt die Verwendung eines DSC-Geräts (Dynamic Scanning Calorimetry) zur Überwachung der Temperaturempfindlichkeit und der insgesamt endothermen Natur in einer bevorzugten Ausführungsform, bei der aktiviertes ACP und DCPD-Precursoren verwendet werden.

**[0252]** Das trockene Precursorgemisch mit gleichen Gewichtsanteilen von ACP und DCPD wird wie in Beispiel 9 beschrieben hergestellt. Wasser (0,05 ml), das vorab auf etwa 4°C abgekühlt wurde, wird zu 47,27 mg des trockenen Precursorgemisches gegeben, worauf es sofort in dem Kalorimeter angebracht wird. Das DSC (Perkin Elmer 7 Series Thermal Analysis System) wird auf eine Starttemperatur von 0°C und eine Scanrate von 5°C/min eingestellt. Die Ergebnisse sind in der **Fig. 16** dargestellt. Die grafische Darstellung zeigt die ersten 7 Minuten; es ist im Wesentlichen zwischen 0,0°C und etwa 20°C kein Wärmestrom zu sehen, wobei an diesem Punkt ein endothermer Wärmestrom einsetzt. Die Eigenschaften des Wärmestroms zeigen, dass die Reaktion bei 37°C im Wesentlichen endotherm ist und die Reaktion unter diesen Bedingungen bei Temperaturen unter 20°C nur sehr langsam oder sogar gar nicht abläuft. Die Nettoaktivität in dem System, d. h. die Summe des endothermen und exothermen Wärmestroms des Systems, ist endotherm.

#### Beispiel 5

**[0253]** Dieses Beispiel beschreibt Schritt für Schritt die Herstellung und Verfahren für die Synthese eines erfindungsgemäßen hochreaktiven amorphen Calciumphosphat.

**[0254]** Ein inertes Carbonat-haltiges amorphes Calciumphosphat wird bei Umgebungstemperatur durch schnelle Zugabe von Lösung B (43 g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (Calciumnitrat-Tetrahydrat) und 1 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O in 0,5 l destilliertem Wasser) zu Lösung A (55 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Natriumphosphat), 50 g NaOH (Natriumhydroxid), 30 g NaHCO<sub>3</sub> (Natriumbicarbonat) und 2 g Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O in 1,3 l destilliertem Wasser) unter kräftigem Rühren hergestellt. Der daraufhin gebildete Niederschlag von gelartigem amorphem Calciumphosphat wird sofort unter Verwendung von Filterpapier (0,05 m<sup>2</sup>) mit einer mittleren Filtergeschwindigkeit unter Vakuum von etwa 10<sup>-2</sup> Torr abfiltriert. Das Material bildet einen dünnen Kuchen und wird mit etwa 4 Litern destilliertem Wasser gewaschen, indem das Wasser in den zum Filtrieren verwendeten Trichter gegeben wird. Das gewaschene Material wird dann mit einem Spatel gesammelt und in einem 2,5 Liter-Behälter in flüssigen Stickstoff getaucht. Nach Bildung von hart gefrorenen Teilen wird der Behälter 24 h in eine Vakuumkammer gebracht (10<sup>-1</sup>–10<sup>-2</sup> Torr), bis

ein feines und trockenes Pulver erhalten wird.

**[0255]** Das oben beschriebene Verfahren kann zwar bei Umgebungstemperatur durchgeführt werden, der gesamte Vorgang findet jedoch vorzugsweise unter Raumtemperatur (4–5°C) statt, so dass noch weitgehender verhindert wird, dass sich die amorphe Form in eine stabilere kristalline Form umwandelt.

**[0256]** Ein Infrarotspektrum des inerten amorphen Materials an diesem Punkt des Verfahrens ist in [Fig. 17a](#) gezeigt. Das Spektrum weist Peaks auf, die für PO-Gruppen (570 und 1040  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\text{CO}_3^{2-}$ -Gruppen (1420, 450  $\text{cm}^{-1}$ ) charakteristisch sind, wobei ein relativ breiter OH-Peak (ungefähr 3550  $\text{cm}^{-1}$ ) vorhanden ist. Das Röntgenbeugungsbild des gleichen Materials zeigt die amorphe Natur des Materials, da im Bereich von  $2\theta = 20\text{--}35$  kein scharfer Peak vorhanden ist.

**[0257]** Das oben beschriebene amorphe Material wird anschließend zur hochreaktiven Form aktiviert, indem es 60 min auf 450°C ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ) erwärmt wird. Das IR-Spektrum des erwärmten Materials ist in [Fig. 17b](#) gezeigt. Das Spektrum zeigt eine Abnahme insbesondere der OH- und  $\text{CO}_3^{2-}$ -Gruppen, was eine signifikante Verminderung von  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CO}_3^{2-}$  in Form von  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  anzeigt. In in ähnlicher Weise hergestellten Proben fiel der Kohlenstoffgehalt um etwa 60%, wobei der Carbonatgehalt insgesamt von 1,56% auf 0,5% fiel. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass die amorphe Natur des Materials während dieses Prozesses erhalten bleibt, wie dies durch das Röntgenbeugungsbild demonstriert wird, das in [Fig. 4a](#) gezeigt ist. Die Messung des Ca/P-Verhältnisses dieses Materials nach der Wärmebehandlung durch eine Elektronenmikrosonde ergab einen Wert von 1,575. Die morphologischen und ultrastrukturellen Eigenschaften des amorphen Materials wurden durch Transmissionselektronenmikroskopie, wie in [Fig. 1](#) gezeigt, bestätigt. Es wird auf die "amorphe" Erscheinung des Materials ohne scharfe Kanten zwischen den Körnern hingewiesen, wobei ein gewisser Bereich des Materials formlos ist (Pfeile).

#### Beispiel 6

**[0258]** ACP wurde, wie in Beispiel 5 beschrieben, synthetisiert, mit dem einzigen Unterschied, dass die Lösungen A und B folgendermaßen hergestellt wurden: Die Lösung A wurde bei Raumtemperatur hergestellt, indem 90,68 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  in 1,2 Liter Carbonat-haltigem destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst wurden. Die Lösung B wurde hergestellt, indem 40,57 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in 1,53 Litern destilliertem Wasser gelöst wurden, das 24 ml einer KOH-Lösung (45 Vol.-%) enthält. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften des bei dieser Vorgehensweise entstehenden amorphen Calciumphosphat ähneln den Eigenschaften des gemäß Beispiel 5 hergestellten Materials.

#### Beispiel 7

**[0259]** Das ACP wird, wie in Beispiel 5 beschrieben, synthetisiert, mit dem Unterschied, dass die Lösungen A und B folgendermaßen hergestellt wurden: Die Lösung A wurde bei Umgebungstemperatur hergestellt, indem 10,58 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in 0,15 Litern Carbonat-haltigem destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  bei einem pH-Wert über 9,5 (mit NaOH eingestellt) schnell gelöst wurden. Die Lösung B wurde hergestellt, indem 7,8 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  in 0,35 Litern destilliertem Wasser gelöst wurden.

#### Beispiel 8

**[0260]** In diesem Beispiel wird die Herstellung von erfindungsgemäßem PCA-Calciumphosphat beschrieben, wobei die trockenen Reaktanten manuell vermischt werden.

**[0261]** Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD) wird bei Umgebungstemperatur hergestellt, indem unter fortwährendem Rühren die Lösung B (17,1 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Calciumnitrit-Tetrahydrat) in 250 ml destilliertem Wasser) schnell zu der Lösung A (10 g  $\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$  (Diammoniumhydrogenphosphat) in 500 ml destilliertem Wasser bei pH 4,6–4,8) gegeben wird. Unmittelbar danach wird die Probe unter Verwendung von Filterpapier (0,05  $\text{m}^2$ ) bei einer mittleren Filtergeschwindigkeit unter Vakuum von etwa  $10^{-2}$  Torr filtriert. Das Material bildet einen dünnen Kuchen, der mit etwa 2 Litern destilliertem Wasser gewaschen und anschließend 24–72 h bei Raumtemperatur getrocknet wird.

**[0262]** Das in Beispiel 5 hergestellte reaktive amorphe Calciumphosphat wird trocken mit dem Dicalciumphosphat-Dihydrat ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) unter Verwendung von Mörser und Stößel 3–5 min. in einer Menge von 50 : 50 Gew.-% physikalisch vermischt. Dann wird Wasser (1 ml/g vermishtes Material) zu dem Pulvergemisch gegeben, um eine pastenartige Konsistenz herzustellen. Die Menge des zugegebenen  $\text{H}_2\text{O}$  variiert in Abhän-

gigkeit davon, ob eine dicke oder dünne Paste gewünscht wird. Das hydratisierte Precursormaterial wird dann locker in feuchtem Seidenpapier eingewickelt und auf 37°C erwärmt. Bei dieser Temperatur härtet die Paste in einer im Wesentlichen endothermen Reaktion zu einer festen Masse aus. Die Härtung kann für einige Stunden verzögert werden, indem die Probe auf 4°C gekühlt wird. Das gehärtete Material besteht aus PCA-Calciumphosphat mit einer Löslichkeit, die die für synthetische Hydroxyapatite angegebenen Löslichkeiten übersteigt. Dies ist in der **Fig. 3** gezeigt, wobei hier die Konzentration der Calciumionen, die bei 37°C während 24 h in eine Pufferlösung mit eingestelltem pH-Wert abgegeben werden, für das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat (Kurve 50) deutlich größer ist als bei Standard-kristallinem Hydroxyapatit (Kurve 52).

#### Beispiel 9

**[0263]** In diesem Beispiel wird die Herstellung eines erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat beschrieben, wobei die trockenen Precursoren vollautomatisch vermischt werden.

**[0264]** Die trockenen ACP- und DCPD-Precursoren werden wie in Beispiel 8 beschrieben hergestellt. ACP und DCPD werden anstatt mit Mörser und Stößel unter Verwendung einer SPEX 8510-Labormühle mit SPEX 8505-Mahlkammer aus Aluminiumoxidkeramik 2 min vermischt. Die Herstellung des hydratisierten Precursors erfolgt, indem 0,7 bis 1,5 ml Wasser auf ein Gramm der vermischten trockenen Precursoren hinzugefügt wird.

#### Beispiel 10

**[0265]** In diesem Beispiel wird die Herstellung von PCA-Calciumphosphat unter Verwendung von DCPDs mit speziellen Korngrößenverteilungen erläutert.

**[0266]** Das DCPD wird wie in Beispiel 8 beschrieben hergestellt. Das trockene Material wird 5 min in einer SPEX 8510-Labormühle mit einer SPEX 8505-Mahlkammer aus Aluminiumoxidkeramik 5 min zerkleinert. Nach der Zerkleinerung wird das Material unter Verwendung einer Schüttelvorrichtung nach Tyler gesiebt, um DCPD mit 8 verschiedenen Korngrößenverteilungen herzustellen (in Tabelle 3 angegeben und in **Fig. 8** gezeigt).

Tabelle 3  
DCPD-Korngrößenverteilungen

Probe	Korngrößenverteilung	Grad der Härtung nach 30 Min., 37 °C
10-1	<25 µm	hart
10-2	25-35 µm	hart
10-3	35-53 µm	hart
10-4	53-63 µm	hart
10-5	Verteilung B3 (Figur 8)	hart
10-6	106-125 µm	nicht vollständig gehärtet
10-7	Verteilung B2 (Figur 8)	nicht vollständig gehärtet
10-8	ungesiebt Verteilung B1 (Figur 8)	nicht vollständig gehärtet

**[0267]** Es hat sich herausgestellt, dass das Zerkleinern des DCPD vor dem Sieben durch ein kurzes Zerkleinern per Hand unter Verwendung von Mörser und Stößel ersetzt werden kann, ohne dass sich die Ergebnisse wesentlich ändern.

**[0268]** Das in Beispiel 5 hergestellte reaktive amorphe Calciumphosphat wurde 1 : 1 (wt/wt) 10 Minuten unter Verwendung einer SPEX 8510-Labormühle mit SPEX 8505-Mahlkammer aus Aluminiumoxidkeramik mit der jeweiligen DCPD-Probe aus Tabelle 3 physikalisch im trockenen Zustand vermischt. Dann wurde Wasser (0,8–1,0 ml/g trockenes Gemisch) zu jedem Pulvergemisch gegeben, um einen hydratisierten PCA-Calciumphosphat-Precursor mit pastenartiger Konsistenz zu bilden. Sechs der acht in Tabelle 3 angegebenen Proben

härten bei 37°C in 30 Minuten gut aus. Die Proben 10-6, 10-7 und 10-8 härteten nicht so schnell oder nicht so fest wie die anderen Proben. Alle diese Proben wiesen deutlich höhere prozentuale Anteile von Partikeln > 100 µm als die anderen Proben auf. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die Verwendung von DCPD mit kleineren Korngrößen zu einer schnelleren und vollständigeren Härtung führt als DCPD mit größeren Korngrößen.

#### Beispiel 11

**[0269]** In diesem Beispiel werden zwei bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung beschrieben.

(a) Gemäß Beispiel 5 hergestelltes reaktives amorphes Calciumphosphat wird in einer Menge von 50 : 50 Gew.-% unter Verwendung einer SPEX 8510-Labormühle mit SPEX 8505-Mahlkammer aus Aluminiumoxidkeramik im trockenen Zustand 2 min mit DCPD mit der Partikelgrößenverteilung B3 aus [Fig. 8](#) vermischt und anschließend auf eine Größe von unter 150 µm gesiebt (Typ 2-Pulver). Dann wird Wasser (0,8 ml/g vermisches Material) zu dem Pulvergemisch gegeben, um den hydratisierten Precursor zu bilden.

(b) Diese bevorzugte Ausführungsform wird gemäß (a) hergestellt, mit dem Unterschied, dass die Proben trocken vermischt und anschließend 10 Minuten gemahlen werden (Typ 10-Pulver).

**[0270]** Für die Pulver vom Typ 2 und Typ 10 sind in weichen Geweben unterschiedliche Resorptionsverhalten zu beobachten; die Resorption in harten Geweben (Knochen) ist für beide Pulver jedoch ähnlich. Dies kann von den unterschiedlichen Absorptionsmechanismen in harten und weichen Geweben herrühren. Untersuchungen in weichem Gewebe sind empfindlicher und können daher für die Beurteilung der Resorbierbarkeit von neuen PCA-Materialien zweckmäßiger sein (siehe Beispiel 16).

#### Beispiel 12

**[0271]** In diesem Beispiel werden alternative Verfahren zur Herstellung von hydratisierten PCA-Calciumphosphat-Precursoren beschrieben.

(a) Reaktives ACP und DCPD werden wie in Beispiel 9 beschrieben hergestellt, mit dem Unterschied, dass die trockenen Precursoren nicht vermischt werden. Wasser (0,8 ml) wird zu dem ACP (0,5 g) gegeben und bis zur Homogenität mit einem Spatel gründlich vermischt, um eine Paste zu bilden. Dann wird DCPD (0,5 g) zu der Paste gegeben und die Paste wird etwa 2 min vermischt. Die resultierende Paste wird 30 min bei 37°C in eine feuchte Umgebung eingebracht.

(b) Reaktives ACP und DCPD werden wie in Beispiel 8 beschrieben hergestellt. Wasser (0,8 ml) wird zu DCPD (0,5 g) gegeben und bis zur Homogenität mit einem Spatel gründlich vermischt, um eine Paste zu bilden. Dann wird das ACP (0,5 g) zu der Paste gegeben und die Paste wird weitere 2 min vermischt. Die resultierende Paste wird 30 min bei 37°C in eine feuchte Umgebung eingebracht.

**[0272]** In beiden Beispielen härtet die Paste nach 30 Minuten, was für eine erfolgreiche Reaktion spricht.

#### Beispiel 13

**[0273]** In diesem Beispiel wird ein Test zur Härtung von PCA-Calciumphosphat beschrieben.

**[0274]** Das PCA-Calciumphosphat wird gemäß Beispiel 9 in Form einer Paste hergestellt. Die Paste wird in ein hohles Teflon®-Rohr von 6 (Durchmesser) × 10 (Tiefe) mm gegeben, das 30 min in 37°C Wasser getaucht wird. Das gehärtete PCA-Calciumphosphat wird dann aus der Röhre entnommen und für 1 Stunde bei 37°C in Wasser gegeben und dann, während es noch feucht ist, senkrecht in eine Vorrichtung Instron 4206 mit einer dualen 10 kg/15 t-Zelle eingebracht. Die Komprimierbarkeit wurde mit einem Crush-Test ermittelt. Etwa 200–250 N sind erforderlich, um die Probe einbrechen zu lassen. Diese Kraft entspricht einer Druckfestigkeit von 7–9 MPa.

**[0275]** Es wurden Poly(lactid)-Whisker mit mittleren Abmessungen von etwa 5–100 µm Durchmesser und 10–250 µm Länge hergestellt. Die Fasern wurden mit der wie oben beschrieben erhaltenen wenigkristallinen Hydroxyapatitpaste in einer Konzentration von 10% (wt/wt) vermischt. Das pastenförmige Verbundmaterial wurde über Nacht in einer feuchten Umgebung bei 37°C gehärtet. Beim Test auf Kompressibilität erweist sich das Material im Vergleich mit dem PCA-Calciumphosphat, das nicht als Verbundmaterial vorliegt, als besser.

#### Beispiel 14

**[0276]** Diese Beispiele zeigen den Einfluss des Fluidvolumens auf die Konsistenz und Reaktivität der injizier-

baren Paste, die zur Bildung von Knochenersatzmaterial verwendet wird. Alle Pasten werden wie in Beispiel 8 beschrieben hergestellt, und es werden die Konsistenz und die Reaktionsrate bei Umgebungstemperatur und 37°C ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4  
Formbarkeit, Injizierbarkeit und Reaktivität der hydratisierten Precursor

Beispiel Nr.	Wasservolumen (ml)	Formbarkeit	Injizierbarkeit	Härtungszeit bei unterschiedlichen Temperaturen (4 °C/RT/37 °C)
14-1	0,7	- bröckelig	-	-/-/-
14-2	0,8*	+ + + einfach gebildete Paste	+	>60 Min./>60 Min./30 Min.
14-3	0,9*	+ + Zahnpasta	+ +	>60 Min./>60 Min./30 Min.
14-4	1,0	+ Flüssig-Zahnpasta	+ + +	>60 Min./>60 Min./30 Min.

\*Unter gewissen Umständen (beispielsweise Verdampfung) können diese Proben nach einer Zeitspanne von einer Stunde bei Umgebungstemperatur etwas austrocknen. In diesen Fällen kann Wasser eingearbeitet werden, um die ursprüngliche Konsistenz wiederherzustellen.

#### Beispiel 15

**[0277]** Subkutane Implantation und Resorption des PCA-Calciumphosphat. Dieses Beispiel erläutert die Resorption von erfindungsgemäßem PCA-Calciumphosphat nach subkutaner Implantation in Ratten. Es wird ferner ein Screeningverfahren erläutert, das zweckmäßig ist, um die Resorptionscharakteristiken der neuen Formulierungen für biokeramische Implantatmaterialien und Verbundmaterialien zu testen.

**[0278]** Acht männliche und acht weibliche Sprague-Dawley-Ratten wurden 4 ml (2–4 g) erfindungsgemäßes PCA (gemäß Beispiel 8 hergestellt) in die dorsale Subkutis implantiert (> 10 × die Menge, die für Menschen auf kg-Basis als maximal angesehen wird). Kontrolltiere wurden mit dem gleichen Volumen Salzlösung behandelt.

**[0279]** Die operativen Eingriffe werden in Beispiel 16 beschrieben. Die Ratten werden nach dem in der Tabelle 5 angegebenen Zeitplan getötet; die Implantationsstelle wird wie in Beispiel 16 angegeben untersucht.

Tabelle 5 Zeitplan	
Zeitpunkt der Tötung	PCA-Calciumphosphat-Implantat
1 Woche	5 m/5 w
2 Wochen	5 m/5 w
1 Monat	5 m/5 w
3 Monate	5 m/5 w
1 Jahr	20 m/20 w

**[0280]** Blut für pathologische klinische Analysen wurde über retroorbitale Sinus-Punktion und kardiale Punktion (alle durch dasselbe Verfahren) gesammelt, während die Tiere mit CO<sub>2</sub> anästhesiert waren. Vor dem Tötungszeitpunkt wurden von jeder Tiergruppe Blutproben genommen. Klinische Untersuchungen der Tiere auf allgemeine Gesundheit und allgemeines Wohlbefinden wurden bis 3 Monate mindestens wöchentlich und

dann monatlich durchgeführt.

**[0281]** Nach 1 Woche lag an der Implantationsstelle PCA-Material vor und war wahrscheinlich in Verbindung mit dem Resorptionsprozess mit leichten bis ausgeprägten Granuloma kombiniert. In Woche 2 war immer noch eine kleine Menge PCA-Material an der Implantationsstelle vorhanden und die assoziierten Granuloma waren leicht bis moderat. In der vierten Woche erschien das meiste Gewebe normal mit einigen wenigen leichten Granuloma an der Implantationsstelle. In der zwölften Woche war kein Anzeichen für das Implantat mehr vorhanden.

#### Beispiel 16

**[0282]** Implantation und Resorption von PCA-Calciumphosphat intramuskulär. In diesem Beispiel wird die Herstellung von PCA-Calciumphosphaten beschrieben, die als Ergebnis von unterschiedlichen Zerkleinerungszeiten in vivo unterschiedliche Resorptionszeiten aufweisen.

**[0283]** Wie in Beispiel 8 beschrieben, wurden trockene Precursor, ACP und DCPD, einzeln hergestellt. Dann wurden mehrere verschiedene Formulierungen mit DCPD und ACP hergestellt durch i) Zerkleinern von DCPD während 15 s, 30 s, 1 min 2,5 min oder 5 min in einem SPEX-Zerkleinerungsgerät, ii) Vermischen des gemahlenden DCPD 1 : 1 mit ACP und iii) Zerkleinern des Gemisches weitere 15 s, 30 s, 1 min, 2, 5 min oder 5 min. Die Zerkleinerungszeiten für die verschiedenen Präparate waren also insgesamt 30 s, 1 min, 2 min (Typ 2-Pulver), 5 min und 10 min (Typ 10-Pulver).

**[0284]** Das PCA-Calciumphosphat, das in Pulverform mit etwa 2,5 Mrad Gammastrahlung sterilisiert wurde, wurde hergestellt, indem das Material in Pulverform verwendet und mit sterilem Wasser oder steriler Salzlösung vermischt und zu etwa 1 cm-Scheiben mit 2 mm Dicke geformt und mindestens 30 min bei 37°C inkubiert wurde.

**[0285]** Die Scheiben wurden männlichen erwachsenen New-Zealand-White-Kaninchen unmittelbar nach der Herstellung implantiert.

**[0286]** Die Tiere wurden Dosierungsgruppen zugeordnet, die bei insgesamt 15 Tieren 3 männliche Tiere aufwiesen. Die Implantate wurden den Kaninchen zufällig zugewiesen. 10–15 Minuten vor dem chirurgischen Eingriff wurde das Tier mit Xylazin (10 mg/kg, i. m.) prämediziert. Dem Tier wurde dann Ketamin verabreicht (50 mg/kg, i. m.). Die dorsale Oberfläche des Tieres wurde geschoren und mit einer chirurgischen Betadinlösung und Alkohol gewaschen. Vor dem Eingriff wurde überprüft, dass das Tier richtig anästhesiert war. Hierzu wurde auf den Fußballen Druck ausgeübt. Wenn es zu keiner Reaktion kommt, ist das Tier richtig anästhesiert.

**[0287]** Während dem gesamten Eingriff wurde das Tier auf Zucken der Barthaare und Zehenreflexe überwacht, die anzeigen, dass das Tier nicht aufwacht.

**[0288]** In einer aseptischen Operation wurde unter Verwendung eines Skalpells ein 1–2 cm langer Einschnitt in der Haut über dem M. Longissimus lumborum angebracht (der auf beiden Seiten der Wirbelsäule verläuft). Nach der Inzision wurden auch die darunter liegende Fascia und der Muskel geschnitten, um die Probe in den Muskel anzubringen. Die Probescheibe wurde direkt in den Muskel platziert, wobei sichergestellt wurde, dass das gesamte Implantat im Muskel eingebettet war. Der Muskel wurde mit einer einzigen absorbierbaren Naht verschlossen und die Haut subkutan vernäht. Zum Verschließen der Inzision an der äußeren Hautoberfläche wurden Metallklammern verwendet. Auf diese Weise wurden an jeder Seite fünf Proben angebracht. Jede Probe wurde am Ende einer Inzision angebracht, die in etwa 1 cm voneinander entfernt waren (siehe Diagramm). Die Proben lagen als 7 mm × 2 mm-Scheiben mit einem Gewicht von etwa 150 mg vor. Die Tiere wurden überwacht und es wurde ihnen beim Aufwachen Buprenorphin verabreicht (0,02–0,05 mg/kg, s. q.). Das Analgetikum wurde nach dem chirurgischen Eingriff drei Tage lang 2 mal pro Tag verabreicht.

**[0289]** Die Tiere wurden unmittelbar nach dem chirurgischen Eingriff und danach alle zwei Wochen geröntgt. Die Röntgenaufnahmen wurden verglichen, um die Resorption des Materials zu verfolgen. Für die Röntgenaufnahmen wurde ein standardisiertes Verfahren eingesetzt, um jegliche Variationen zwischen den Aufnahmezeitpunkten möglichst klein zu halten.

**[0290]** Nach der Tötung wurden die Implantatstellen zunächst auf makroskopischer Ebene untersucht. An den Stellen, an denen die Implantate zu sehen sind, treten sie als graue bis gelbe feste Scheiben in Erscheinung. Dort, wo das Implantat resorbiert wurde, sind Bereiche des Muskels mit rot bis bräunlicher Entfärbung



zu sehen.

**[0291]** Das Muskelgewebe wurde mit den Implantaten entfernt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Implantate nicht beeinträchtigt wurden. Die Gewebe und die Erkennungszeichen wurden in beschriftete Gefäße gegeben, die mit 10% gepuffertem Formalin gefüllt waren. Alle Implantatstellen wurden bearbeitet und mikroskopisch beurteilt. Die Beobachtungen umfassen fokale Fibrose, fokale granulomatöse Entzündung und das Aussehen des Implantats (in einigen Fällen). Die Fibrose tritt primär als Fibrozyten und Collagen in Erscheinung. Tiere mit makroskopischer Resorption zeigten Fibrose und minimale bis mäßige granulomatöse fokale Entzündung. Die granulomatöse Entzündung zeigte sich in Form von fokalen Aggregaten von Makrophagen und Riesenzellen, häufig mit intrazytoplasmatischen Kristallen und gelegentlich Heterophilen und Lymphozyten. Bei der Entzündung um die nicht resorbierten Implantate handelte es sich hauptsächlich um minimale bis leichte Fibrose und/oder granulomatöse Entzündung, wobei beide im für intramuskuläre Implantate akzeptablen Bereich lagen.

**[0292]** Nach vier Wochen waren die aus den PCA-Calciumphosphat-Implantaten hergestellten Pellets, die durch Zerkleinern während 30 Sekunden, 1 Minute oder 2 Minuten hergestellt waren, vollständig resorbiert. Die Implantate, die durch Zerkleinern für 5 Minuten oder 10 Minuten hergestellt waren, waren nicht vollständig resorbiert.

#### Beispiel 17

**[0293]** Reaktives amorphes Calciumphosphat wird gemäß Beispiel 5 hergestellt und nach dem in Beispiel 8 beschriebenen Verfahren mit der folgenden Modifizierung mit anderen Calciumphosphatverbindungen trocken vermischt. Anstelle von DCPD wurden die folgenden Calciumphosphatverbindungen verwendet, wobei diese Aufzählung nicht einschränkend zu verstehen ist:  $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$  (Calciummethaphosphate),  $\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$  (Heptacalciumphosphat),  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  (Calciumpyrophosphat),  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Tricalciumphosphate). Das Verhältnis des trockenen Gemisches wurde so berechnet, dass die Ca/P-Verhältnisse in Abhängigkeit von dem molaren Ca/P-Verhältnis der mit dem reaktiven amorphen Calciumphosphat vermischten Verbindung im Bereich von 1,5 bis 1,70 lagen. Das Entstehen von PCA-Calciumphosphat in dem resultierenden Material wurde dann mit XRD und FTIR bestätigt.

#### Beispiel 18

**[0294]** In diesem Beispiel wird die Umwandlung, die beim Härten des hydratisierten Precursors auftritt, unter Verwendung von Röntgenbeugung und Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie verfolgt.

**[0295]** Der hydratisierte Precursor wurde, wie in Beispiel 9 beschrieben, hergestellt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C in eine feuchte Umgebung eingebracht und zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Röntgenbeugungsanalyse untersucht. Die [Fig. 5a–d](#) zeigen die Röntgenbeugungsspektren des Reaktionsproduktes von DCPD und reaktivem amorphen Calciumphosphat gemäß Beispiel 5. Die Bedingungen beim Röntgenscan sind (a) Kupferanode, (b)  $\lambda = 1,4540598$  und (c) Scanbereich 20–35° in Schritten von 0,02° und einem Schrittintervall von 2 Sekunden. **Fig. 6** zeigt das Infrarotspektrum von Dicalciumphosphat-Dihydrat ([Fig. 6a](#)), erfindungsgemäß aktiviertem ACP ([Fig. 6b](#)) und erfindungsgemäßem wenigkristallinen Hydroxyapatit ([Fig. 6c](#)).

**[0296]** Die in den [Fig. 5a–Fig. 5d](#) gezeigten Proben wurden 0,20 min, 75 min bzw. 5 Stunden inkubiert. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entfernt und lyophilisiert, damit die chemischen Eigenschaften erhalten blieben. [Fig. 5a](#), die bei der beginnenden Reaktion aufgenommen wurde, stellt eine Kombination von Peaks dar, die dem Ausgangsmaterial ACP und Dicalciumphosphat (siehe **Fig. 4** für die XRD-Aufnahmen der Komponenten) zugeordnet werden können. Die scharfen Peaks bei ca. 20,25°, 23,5°, 29,5°, 30,75° und 34,3° für kristallines Dicalciumdiphosphat sind leicht zu identifizieren. Mit steigender Reaktionszeit nehmen die scharfen kristallinen Peaks ab und breite (amorphe) Peaks tauchen mit dem Zentrum bei  $2\theta = 26^\circ, 28,5^\circ, 32,0^\circ$  und  $33,0^\circ$  auf. Es ist interessant, dass das Spektrum sich nach 75-minütiger Reaktion nicht mehr ändert, was anzeigt, dass die Reaktion in etwas mehr als einer Stunde vollständig ist. Das Röntgenbeugungsbild des erfindungsgemäßen Knochenersatzmaterials ([Fig. 5d](#)) kann mit der Aufnahme von natürlich vorkommenden Knochen (in [Fig. 7](#) gezeigt) verglichen werden. Die zwei Spektren sind nahezu identisch.

#### Beispiel 19

**[0297]** Implantation und Resorption von PCA-Calciumphosphat in Knochen.

**[0298]** Der Zweck dieser Untersuchung bestand darin, die Resorption und Ossifizierung von PCA-Calciumphosphat an einer knöchernen Implantationsstelle zu untersuchen. Dieses Verfahren ist auch zweckmäßig, um die Resorptions- und Ossifizierungseigenschaften von erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat-Formulierungen und -Verbundmaterialien zu testen.

**[0299]** Bei dem zu testenden Gegenstand handelt es sich um eine PCA-Calciumphosphat-Formulierung, die gemäß Beispiel 8 hergestellt wurde. ACP und DCPD wurden in den angegebenen Anteilen vermischt und 1 Minute, 30 Sekunden in dem SPEX-Gerät zerkleinert.

**[0300]** Erwachsene (> 5 Monate alt) männliche NZW-Kaninchen wurden in Quarantäne gehalten und mindestens 10 Tage vor dem Beginn der Studie akklimatisiert. Die Tiere wurden einzeln in hängenden Käfigen aus Edelstahl untergebracht. Unter den Käfigen wurden Holzspäne in Auffangwannen vorgesehen. Vor dem Beginn der Studie wurden die Tiere zufällig Gruppen oder Behandlungen zugeordnet und sie wurden durch eine am Ohr tätowierte Nummer und eine entsprechende Karte am Käfig identifiziert. Bei allen Tieren wurde ein Defekt in einem Schienbein platziert. Die Zeitpunkte für die Bestimmungen waren 2, 4 und 8 Wochen (zu jedem Zeitpunkt 2 Tiere). Der chirurgische Eingriff wurde unter Vollnarkose und aseptischen chirurgischen Bedingungen durchgeführt.

**[0301]** Nach geeigneter Anästhesie (beispielsweise Ketamin/Xylazin) wurde durch einen aseptischen Eingriff ein Schnitt seitlich proximal an der Tibia angebracht. Das weiche Gewebe wurde umgeschlagen und der Knochen freigelegt. Unter Verwendung eines Bohrers mit etwa 5 mm in einem bei niedriger Geschwindigkeit arbeitenden Dentalhandgriff wurde erforderlichenfalls unter Spülen (0,9% physiologische Salzlösung) ein Loch von ~5,5 mm Durchmesser durch die Kompakta des Knochens gebohrt. Die Knochenscheibe wurde aus dem Kortex freigelegt und die Stelle wurde für die Implantation vorbereitet. Das hydratisierte Precursormaterial wurde in Pastenform in den Defekt eingebracht. Defekte in Kontrolltieren blieben unbehandelt. Die weichen Gewebe wurden anschließend in Schichten geschlossen, unter Anwendung dieses Verfahrens wurde pro Tier eine Probe hergestellt.

**[0302]** Mindestens wöchentlich wurde die allgemeine Gesundheit und das Wohl der Tiere klinisch überwacht, wobei ein spezielles Augenmerk auf ihre Bewegungsfähigkeiten gerichtet wurde. Alle Tiere schienen bei guter Gesundheit zu sein. Am Ende der Studie wurden die Tiere mit einer Überdosis Anästhetikum getötet und die Implantationsstelle wurde gewonnen. In vorgegebenen Zeitintervallen nach dem chirurgischen Eingriff und bei der Autopsie wurden Röntgenbilder der Tibiae aufgenommen.

**[0303]** Die Implantationsstellen wurden in Formalin fixiert und entweder mit Hämatoxylin und Eosin, Masson-Trichrom oder von Kossa-Färbung (entkalkte Proben) angefärbt. Es wurden auch nicht entkalkte histologische Proben hergestellt und mit Fuchsin (basisch, hellgrün) gefärbt. Die Präparate wurden mikroskopisch von einem Paneel zertifizierter Veterinärpathologen (ACVP) mit Erfahrung in Labortierpathologie beurteilt. Die Knochenmorphologie und die Gegenwart oder das Fehlen von organisiertem Knochengewebe und nachweisbarem PCA-Calciumphosphat wurde subjektiv bewertet.

**[0304]** Die histologischen Befunde weisen auf etwas Mineralisierung nach 2 Wochen hin. Nach 4–6 Wochen hatten die Tiere mit Implantaten normale Knochenbälkchen an der Implantationsstelle, wobei kein Hinweis auf verbleibendes PCA-Calciumphosphat gefunden werden konnte. Die unbehandelten Kontrolltiere waren nicht vollständig ausgeheilt, da sie kein vollständiges Einwachsen zeigten und/oder Knochen vom Nichtkortikaltyp aufwiesen. Die [Fig. 9a](#) und [Fig. 9b](#) zeigen mikroskopische Aufnahmen von unbehandelten und behandelten Tibiadefekten 2 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff. Es ist ersichtlich, dass der Knochen rechts von der Defektkante in der unbehandelten Probe ([Fig. 9a](#)) ein dünner trabekulärer Knochen ist; bei dem neuen Knochen rechts von der Defektkante in der behandelten Probe ([Fig. 9b](#)) handelt es sich um dicken trabekulären Knochen.

#### Beispiel 20

**[0305]** Dieses Beispiel zeigt die unterschiedliche Resorptionszeit von zwei Precursorformulierungen mit unterschiedlichen DCPD-Korngrößenverteilungen. Das PCA-Calciumphosphat-Precursormaterial wird gemäß Beispiel 10 hergestellt. Es werden zwei Precursorgemische hergestellt. Probe A entspricht Probe 10-6 und Probe B entspricht einem 2 : 4 : 3 : 1-Gemisch der Proben 10-1, 10-2, 10-3 und 10-4. Hydratisierte Precursorpasten der beiden Proben wurden in Nagetieren in dem in Beispiel 15 beschriebenen Subkutantest untersucht. Die Resorption wird zu verschiedenen Zeitpunkten kontrolliert.

## Beispiel 21

**[0306]** Dieses Beispiel zeigt den Unterschied in der Promotoraktivität von DCPD mit zwei unterschiedlichen Korngrößenverteilungen bei der Umwandlung von hochreaktivem ACP und reaktivem ACP.

**[0307]** Das ACP wurde gemäß Beispiel 5 hergestellt, mit dem einzigen Unterschied, dass bei einigen Proben die letzte Wärmeaktivierung nicht durchgeführt wurde. Es wurden zwei DCPD-Proben mit den Korngrößenverteilungen B1 und B3 von Beispiel 10 hergestellt. Die ACPs und DCPDs wurden entweder mit der Hand oder in dem SPEX-Gerät 5 Minuten vermischt. Dann wurden die Härtungseigenschaften ermittelt. Es ist klar ersichtlich, dass die mit der Maschine zerkleinerten Proben bessere Härtungseigenschaften aufweisen als die mit der Hand zerkleinerten Proben. Es ist außerdem klar ersichtlich, dass die Proben mit der kleineren Partikelgröße (B3) bessere Härtungseigenschaften haben als die Proben mit den größeren Körnern (B1).

Tabelle 6  
Reaktionen unter Verwendung von verschiedenen starken Promotoren

ACP	DCPD	Zerkleinern	Härten @ 30 min
erwärmt	B3	Mörser & Stößel	+ +
nicht erwärmt	B3		(nicht untersucht)
erwärmt	B1		+ / -
nicht erwärmt	B1		-
erwärmt	B3	SPEX 5-10 min-	+ + +
nicht erwärmt	B3		+ + +
erwärmt	B1		+
nicht erwärmt	B1		(nicht untersucht)

## Beispiel 22

**[0308]** In diesem Beispiel wird die spezifische Oberfläche und die Porosität des PCA-Calciumphosphat ermittelt.

**[0309]** ACP wird gemäß Beispiel 5 hergestellt. Vor und nach dem letzten Wärmeaktivierungsschritt erhaltene Proben wurden in einem Härtungs-Versuch in vitro auf ihre Reaktivität mit ungesiebttem DCPD (wie in Beispiel 8 beschrieben) untersucht. Es wurde auch die spezifische Oberfläche und die mittlere Porosität gemessen. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7  
Spezifische Oberfläche und Porosität von erfindungsgemäßen ACPs

Probe	Spezifische Oberfläche (m <sup>2</sup> /g)	mittlere Porosität (Å)	DCPD-Reaktivität
Vor dem Erwärmen	120,5	130	-
Nach dem Erwärmen	76,8	129	+

## Beispiel 23

**[0310]** In diesem Beispiel wird die Umwandlung von ACP in PCA-Calciumphosphat in Abwesenheit eines Promotors beschrieben und es wird gezeigt, dass das neu gebildete PCA-Calciumphosphat nicht härtet. In gleicher Weise härtet der Promotor DCPD nicht oder wandelt sich nicht selbst um.

**[0311]** DCPD und mehrere ACPs und andere Calciumphosphate werden mit Wasser gemischt und auf ihre Fähigkeit getestet, bei 37°C zu härten. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse und die Identifizierung der Reaktionsprodukte, falls diese anfielen, nach dem Testzeitraum angegeben. In keinem Fall wurde in einem Zeitraum von 3 Tagen ein Härten beobachtet. Daraus wurde geschlossen, dass die Gegenwart eines Promotors für das Ab-

binden und Härten günstig ist, wenn auch eine Umwandlung von ACP in PCA-Calciumphosphat stattfinden kann.

Tabelle 8  
ACP-Umwandlung bei Abwesenheit eines Promotors

ACP	H <sub>2</sub> O (g)	Inkubation	Härten	FTIR	XRD
ACP (Beispiel 5)	0,8	30 min 12 h	weich weich	ACP PCA*	ACP PCA*
DCPD (Beispiel 8) 35-53 µm	0,7	30 min 12 h	weich weich	DCPD DCPD	ND
ACP (Beispiel 7) nicht wärmeaktiviert	1,5	30 min 12 h	weich weich	PCA* Hydroxyapatit	ND
ACP (Beispiel 5) nicht Carbonat-haltig	1,5	30 min	weich	ACP	ND
ACP (Beispiel 6) nicht wärmeaktiviert	1,5	30 min	weich	ACP	ND
ACP (Beispiel 5) nicht Carbonat-haltig, wärmeaktiviert	1,5	30 min	weich	PCA*	ND

\*PCA wenigkristallines apatitisches Calciumphosphat

ND Analyse nicht durchgeführt

#### Beispiel 24

**[0312]** Einfluß von verschiedenen Hydratisierungsmitteln auf das Härten und das Endprodukt.

**[0313]** Ein hydratisierter Precursor (ACP und DCPD) wurde, wie in den Beispielen 8, 9 oder 10 beschrieben, hergestellt, mit dem Unterschied, dass mehrere Hydratisierungsmedien verwendet wurden. Die Proben wurden anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten auf Härte und vollständige Reaktion getestet. In allen Fällen wurde 1 g der gemischten Precursoren mit 0,75–1,0 ml Hydratisierungsmedium vermischt, um eine Paste herzustellen. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse zusammengefasst worden; die Tabelle zeigt, dass eine Vielzahl von Flüssigkeiten auf Wasserbasis und insbesondere physiologisch akzeptable Medien für die Herstellung des PCA-Calciumphosphat verwendet werden können.

Tabelle 9  
Effekt von Hydratisierungsmitteln

Hydratisierungsmedium	Inkubationszeit	Härtung
Tris	30 min	hart
0,9M NaCl	30 min	hart
MEM	30 min	hart
MOPS	30 min	hart
HEPES	30 min	hart
BUFFERALL	30 min	hart
PBS	30 min	hart

## Beispiel 25

**[0314]** ACP wurde wie in Beispiel 5 beschrieben hergestellt, mit dem Unterschied, dass das ACP entweder 1 Stunde oder 6 Stunden auf 450°C erwärmt wurde. Nach dem Erwärmen wurde das ACP für die Umsetzung mit dem DCPD wie in Beispiel 8 beschrieben behandelt. Der mit dem für 6 Stunden erwärmten ACP hergestellte hydratisierte PCA-Calciumphosphat-Precursor härtet nach 2 Stunden bei 37°C nicht aus.

## Beispiel 26

**[0315]** Es wurde die Porosität an einer gehärteten PCA-Calciumphosphatprobe ermittelt, die gemäß Beispiel 10-5 hergestellt wurde.

**[0316]** Eine gehärtete Probe von PCA-Calciumphosphat (1 g) wurde unmittelbar nach der Entnahme aus dem feuchten Inkubator gewogen und dann bei Raumtemperatur 12 h luftgetrocknet. Die getrocknete Probe wurde sorgfältig gewogen, worauf das Volumen berechnet wurde. Die Probe wurde in 20 ml Wasser gegeben. Nach einer Minute wurde das ungefähre Verdrängungsvolumen notiert. Es wurde festgestellt, dass die trockene Probe H<sub>2</sub>O in einer Menge von bis zu 50–60% ihres Trockengewichts absorbiert. Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass die Probe bis zu 50–60% porös ist. Die Dichte wurde zu etwa 1,65 g/cm<sup>3</sup> bestimmt.

## Beispiel 27

**[0317]** Dieses Beispiel zeigt die Verwendung eines resorbierbaren Polymers zur Förderung der Umwandlung von ACP in PCA-Calciumphosphat.

**[0318]** Körniges PLLA wurde hergestellt und auf eine Größe von 100 µm gesiebt. Das so erhaltene Pulver wurde mit ACP (5 : 1 ACP : PLLA) aus Beispiel 9 vermischt und 5 Minuten in einer SPEX-Labormühle zerkleinert. Zu 1 g Gemisch wurde Wasser gegeben, um eine verarbeitbare Paste herzustellen. Die Paste wird zu einem Ball geformt und in einer feuchten Umgebung 1 h auf 37°C erwärmt. Die gehärtete Probe wird mit FTIR und XRD analysiert.

## Beispiel 28

**[0319]** In diesem Beispiel werden die Härtungseigenschaften des hydratisierten Precursors bei Temperaturen unter Raumtemperatur ermittelt.

**[0320]** Der hydratisierte Precursor wurde wie in Beispiel 9 beschrieben mit Wasser hergestellt und dann entweder in Parafilm oder einem Aluminiumröhrchen dicht verschlossen, um Verluste durch Verdampfung zu vermeiden. Die Proben wurden dann 1 h, 24 h und 6 Tage aufbewahrt.

**[0321]** Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die hydratisierten Proben aus dem Kühlschrank in eine feuchte Umgebung von 37°C gebracht. In allen Fällen härteten die Proben innerhalb von 30 Minuten.

## Beispiel 29

**[0322]** Dieses Beispiel zeigt die Wirksamkeit des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat zur Förderung der Heilung eines großen Segmentdefekts in einem gewichtsbelasteten Glied am Großtier-Modell.

**[0323]** Hydratisierte Precursoren Typ 2 und Typ 10 wurden wie in Beispiel 16 beschrieben hergestellt und unmittelbar vor dem chirurgischen Eingriff behandelt.

**[0324]** 24 Stunden vor der Anästhesie fasteten die Tiere, wobei während dieses Zeitintervalls Wasser ad libitum verfügbar war. 15 Minuten bevor die Tiere vollständig anästhesiert wurden, wurden Ketamin (Aescoket®, 10 mg/kg i. m.) und Atropin (1,5 mg i. m.) als Prämedikation verabreicht. Als Anästhetikum wurde Etomidat (Hypnomidaat®, 0,3 mg/kg i. v.) verwendet. Nach der Intubation wurde die Anästhesie mit einem O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O-Gemisch (1 : 1, Vol/Vol) mit 2% Isofluran aufrechterhalten.

**[0325]** Der chirurgische Eingriff wurde aseptisch unter voller Anästhesie durchgeführt. Nach dem Scheren und Behandeln der Haut mit Iod wurde anteromedial an der Tibia geschnitten. Die Muskeln wurden zertrennt und der Tibialschaft wurde so weit als möglich aus dem Gewebe freipräpariert. Nach Aufweiten des Cavum medullare wurde ein Marknagel (Durchmesser 8 mm) über ein Loch in das vordere Tibialplateau eingeführt. Der eingeführte Nagel wurde mit zwei proximalen und zwei distalen Bolzen arretiert. Dann wurde mit einer Drahtsäge und einer Schwingsäge ein 20 mm großer osteoperiostaler Segmentdefekt in der Schaftmitte der Tibia gebildet.

**[0326]** Der Defekt wurde in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe unterschiedlich gefüllt. Bei einer Gruppe wurde autologes Knochengewebe aus dem ipsilateralen Beckenkamm gewonnen und in den Defekt eingebracht. Bei der anderen Gruppe wurden etwa 2–4 g hydratisierter PCA-Calciumphosphat-Precursor (Typ 2 oder Typ 10) zum Auffüllen des Defekts per Hand appliziert. Die weichen Gewebe und die Haut wurden mit resorbierbarem Nahtmaterial schichtweise geschlossen.

**[0327]** Den Tieren wurde postoperativ 3 Tage lang Lincomycin/Spectinomycin (Vualin Plus®, 5 mg/10 mg pro kg pro Tag) intramuskulär injiziert. Die Tiere wurden auf der Weide gehalten, sobald die volle Gewichtsbelastung des operierten Glieds möglich war. Die Tiere wurden vor der Explanat der Tibiae folgendermaßen getötet: Als Prämedikation wurde Ketamin (Aescoket®, 500 mg i. m.) und Xylazin (Rompun®, 40 mg i. m.) verabreicht. Dann wurden 0,5 mg Fentanylcitrat (Fentanyl®), 10 mg Etomidat (Hypnomidate®), 4 mg Pancuroniumbromid (Pavulon®) und 1,4 g Kaliumchlorid intravenös verabreicht.

**[0328]** Die Tiere, die das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat erhielten, zeigten nach drei Monaten komplette Heilung. Die Knochen wurden disseziert und auf Festigkeit untersucht. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass das erfindungsgemäße PCA-Calciumphosphat resorbiert und ossifiziert und in weniger als 3 Monaten Knochengewebe äquivalent zu oder besser als bei autologen Implantaten gebildet wurde.

## Beispiel 30

**[0329]** Der Zweck dieser Studie besteht darin, die Resorption, Ossifizierung und Biokompatibilität von zwei Formulierungen des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat am Hundekiefer zu untersuchen. Vorgehärtetes PCA-Calciumphosphat wurde in einem mandibularen Anlagerungsmodell am Hund implantiert, das auch als Augmentationsmodell dienen kann.

**[0330]** Bei dem getesteten Gegenstand handelt es sich um PCA-Calciumphosphat in zwei Formulierungen, nämlich Typ 2 und 10 gemäß Beispiel 11. Das PCA-Calciumphosphat wurde in einer feuchten Umgebung bei etwa 40°C unmittelbar vor der Implantation vorgehärtet. Als Kontrollimplantate dienten 3 mm × 4 mm-Zylinder aus Silicon bzw. porösem Hydroxyapatit.

**[0331]** Zwei weibliche erwachsene Jagdhunde (20 bis 25 kg) wurden in der Studie eingesetzt. Beide Hunde erhielten zwei Kontrollimplantate, (jeweils 1) an der rechten Seite des Unterkiefers und jeweils ein Implantat aus PCA-Calciumphosphat vom Typ 2 und Typ 10 auf der linken (gegenüberliegenden) Seite.

**[0332]** Die Implantation erfolgte unter voller Anästhesie und aseptischen chirurgischen Bedingungen. Die Tiere wurden mit Beruhigungsmitteln und Wirkstoffen vom Atropin-Typ ruhiggestellt und die Anästhesie wurde mit Barbituraten eingeleitet. Die Lebenszeichen der Tiere (Temperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz) wurden vor und während des Eingriffs überwacht. Die Tiere wurden durch Zehenkneifen und kornealen Reiz auf die An-

ästhesietiefe getestet. Nach geeigneter Anästhesie wurde aseptisch in der Haut über der mediolateralen ventralen Oberfläche des Unterkiefers und proximal am Hals (über die Unterkante des Unterkiefers) ein Schnitt angebracht. Das weiche Gewebe wurde weggeschlagen und der Knochen freigelegt. Das Periosteum über der äußeren Unterkieferfläche wurde gehoben und die Knochenoberfläche mit einer Fräse oder einem Bohrer aufgeraut, bis sie rau und blutig und zur Aufnahme des zylindrischen Implantats bereit war. Die Kontrollgegenstände und das vorgehärtete PCA-Calciumphosphat wurden dann in die Defekte eingebracht. Zwei Proben pro Tier pro Seite wurden nach diesem Verfahren an jeder äußeren Unterkieferfläche aufgebracht (zwei PCA-Calciumphosphatproben und zwei Kontrollproben). Die Proben waren etwa 1 cm beabstandet, um zu gewährleisten, dass sie sich nicht gegenüberliegen. Das Periosteum wurde zuerst unter Verwendung von 3.0 Vicryl geschlossen. Dann wurden die weichen Gewebe schichtweise mit resorbierbarem Nahtmaterial aus 3-0 Vicryl geschlossen. Die Haut wurde mit einer einfachen, unterbrochenen Naht mit Nylon 5-0 geschlossen. Die Wunden der Tiere konnten für vorgegebene Zeitspannen heilen. Ein Hund wurde 3 Wochen und der andere 3 Monate danach getötet und die Teststellen wurden für die Histologie entfernt. Alle Tiere wurden euthanasiert und die Erkennungszeichen wurden entnommen.

**[0333]** Die Implantationsstellen wurden als nicht dekalzifizierte Sektionen präpariert. Diese Sektionen wurden auf Biointegration, Biodegradation und Biokompatibilität untersucht.

**[0334]** Die Ergebnisse waren die folgenden: Es wurde zu allen Zeitpunkten eine hervorragende Biokompatibilität festgestellt. Es wurden keine Riesenzellen und minimal Makrophagen beobachtet. Es war nur eine minimale Reaktionsschicht von nur einigen Zellen Dicke an der Basis der PCA-Calciumphosphat-Implantate zu ermitteln. Dies ist signifikant besser als die mit allen Kontrollen erhaltenen Ergebnisse.

**[0335]** Nach drei Wochen ist der Hauptteil des Typ 2-Materials resorbiert. Nach zwölf Wochen ist das Typ 2-Material vollständig zur Oberfläche des ursprünglichen Knochens resorbiert. Zusätzlich ist der Knochen in den Alveolen nicht vollständig differenziert.

**[0336]** Die Typ 10-Proben zeigten Osseointegration mit Einwachsen von neuem Knochengewebe und Zellmigration in das Implantat. Das Implantat selbst war nach zwölf Wochen zu etwa 10% resorbiert.

**[0337]** Das Kontrollimplantat aus Silicon, das nicht resorbierbar ist, zeigte eine schwache bis moderate Fremdkörperreaktion. Die Lücken waren nach drei Wochen nicht gefüllt, nach zwölf Wochen jedoch mit einem fibrösen Gewebe gefüllt. Das Hydroxyapatit-Kontrollimplantat zeigte keine Anzeichen von Resorption oder Osseointegration innerhalb der ersten zwölf Wochen.

**[0338]** Dieses Experiment bestätigt die hervorragende Biokompatibilität des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat. Außerdem wurde bei den beiden PCA-Formulierungen ein Unterschied in der Resorptionszeit beobachtet, wobei die Resorptionszeit bei der Probe, in der der Precursor eine längere Zeitdauer vermischt/zerkleinert wurde (Typ B), länger war.

**[0339]** Die Ergebnisse zeigen ferner die langsameren Resorptions- und Ossifizierungseigenschaften, die an einer nicht gewichtsbelasteten Implantationsstelle am Unterkiefer im Vergleich zu der schnellen Ossifizierung von belasteten Applikationen gemäß Beispiel 29 beobachtet wurden. Schließlich zeigen die Ergebnisse das Bedürfnis für langsam resorbierende PCAs für einwandfreie Osseointegration bei der chirurgischen Augmentationsplastik.

#### Beispiel 31

**[0340]** Dieses Beispiel demonstriert den Effekt der Aufbewahrung des hydratisierten Precursors unbedeckt bei Raumtemperatur.

**[0341]** Der trockene Precursor wird wie in Beispiel 11(b) beschrieben hergestellt. Der trockene Precursor wird mit der angegebenen Wassermenge vermischt und auf Härten und Injizierbarkeit durch eine Injektionsnadel Nr. 16 getestet, nachdem er verschiedene Zeitspannen unbedeckt bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 10 angegeben.



Tabelle 10  
Injizierbarkeit der Paste nach Aufbewahren bei Raumtemperatur

Probenge- wicht (g)	Wasser zugegeben (ml)	Mischdauer (s)	Standzeit (min)	Temperatur (°C)	Injizierbar- keit mit Nadel Nr. 16	Härtung 30 min/37°C
1	0,8	20	10	25	sehr gut	sehr gut
1	0,8	20	20	24	sehr gut	sehr gut
1	0,8	20	30	25	sehr gut	sehr gut
1	0,8	20	40	25	gut	sehr gut
1	0,8	20	50	24	schlecht	sehr gut
5	4,2	40	10	24	sehr gut	sehr gut
5	4,2	40	20	25	sehr gut	sehr gut
5	4,2	40	30	25	gut	sehr gut
5	4,2	40	40	25	schlecht	sehr gut

**[0342]** Die Ergebnisse zeigen, dass ein Gramm Probe bei Umgebungsbedingungen bei zu 45 Minuten als injizierbare Paste stabil bleibt und 5 Gramm Probe bis zu 30 Minuten bei Umgebungsbedingungen (an Luft, 25°C) als injizierbare Paste stabil ist.

#### Beispiel 32

**[0343]** Komprimieren von Precursoren unter Verwendung einer hydraulischen Presse. Dieses Beispiel erläutert das Verfahren zur Herstellung eines Pellets mit einer hydraulischen Presse.

**[0344]** Es wird eine Carver Laborpresse verwendet. Das Gewicht einer spezifischen Pulvermenge wird ermittelt. Das Pulver wird dann in die Pressform gegeben. Die Höhe und Dicke wird zum Teil durch die in der Form verwendete Materialmenge vorgegeben. Nach Einbringen des Materials in die Pressform wird die Form unter der hydraulischen Presse angebracht. An der Presse wird die gewünschte Last eingestellt. Das Material wird dann für eine vorgegebene Zeitspanne komprimiert. Nach dem Ablauf der Zeitspanne wird das resultierende Pellet aus der Pressform in einen Aufbewahrungsbehälter überführt.

**[0345]** Eine 0,5 g-Probe (ID = AB com1, aus Lot AB971002) wurde bei 500 psi (pounds per square inch) in der Carver-Laborpresse 5 Minuten komprimiert. Die physikalischen Eigenschaften des resultierenden Pellets waren: Durchmesser = 13 mm, Höhe = 3 mm, die Dichte betrug 1,27 g/cm<sup>3</sup>. Die mechanische Festigkeit wurde als hart und mit der Hand zu zerbrechen beschrieben. Durch FTIR-Analyse ergab sich am Pellet: 70% PCA in feuchtem Gewebe, 9% PCA in 20 ml destilliertem Wasser und 100% PCA in Carbonat-haltiger Pufferlösung (CO<sub>3</sub> – 2 0,2 Mol). Eine zweite Probe von 0,5 g (ID = ABcom2, aus Lot AB971002) wurde bei 4700 psi in der Carver-Laborpresse 5 Minuten komprimiert. An dem Pellet wurden die folgenden Ergebnisse erhalten: Durchmesser = 13 mm, Höhe = 2 mm und Dichte = 1,99 g/cm<sup>3</sup>. Die mechanische Festigkeit wurde als sehr hart und mit der Hand zu zerbrechend beschrieben. Nach Inkubation bei 37°C für 60 Stunden und Analyse mit FTIR wurden die folgenden Ergebnisse erhalten: 60% PCA in nassem Gewebe, 60% PCA in 20 ml destilliertem Wasser und 60% PCA in Carbonat-haltiger Pufferlösung (CO<sub>3</sub> – 2 0,2 Mol).

#### Beispiel 33

**[0346]** Komprimieren von Precursoren unter Verwendung einer Handpresse.

**[0347]** Dieses Beispiel zeigt das Verfahren zur Herstellung eines Pellets mit einer Handpresse.

**[0348]** Es wurde eine Perkin Elmer Quick Press verwendet. Pellets von 7 mm Durchmesser wurden hergestellt, indem in Verbindung mit der Quick Press vorgewählte Formensets verwendet wurden. In Abhängigkeit

von den gewünschten Untersuchungen können auch andere Formensets mit unterschiedlichen Durchmessern verwendet werden. Die Oberfläche des Pellets kann flach oder rund sein und hängt von der Form des Formwerkzeugs ab. Die Probe wird in die gewählte Form gegeben. Mit steigender Probenmenge steigt auch die Dicke des Pellets. Als Nächstes wird aus den verschiedenen manuellen Positionen im oberen Teil der Quick Press eine Referenzposition ausgewählt. Die Form wird in die Quick Press eingebracht. Für eine vorgewählte Zeitspanne wird mit dem Handgriff der Quick Press ein konstanter Druck ausgeübt. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wird das Pellet aus der Form entfernt, indem der untere Deckel von der Form entfernt und zum Ausstoßen des Pellets von oben an der Form Druck ausgeübt wird.

**[0349]** Eine 0,08 g Probe (ID: AB com3, aus Lot AB971002) wurde in der Form mit 7 mm Durchmesser untersucht. Die manuelle Position der Quick Press wurde auf 20 eingestellt, man komprimiert 1 Minute. Das resultierende Pellet weist einen Durchmesser von 7 mm und eine Höhe von 1,5 mm auf; die Dichte beträgt 1,39 g/cm<sup>3</sup>. Eine zweite Probe (ID: AB com4, 0,1 g, aus Lot 971002) wurde in die 7-mm-Durchmesser-Form eingebracht. Die manuelle Position wurde auf 20 eingestellt, es wurde 30 Sekunden in der Quick Press komprimiert. Der resultierende Pellet hat einen Durchmesser von 7,0 mm und eine Höhe von 2,0 mm, die Dichte ist 1,23 g/cm<sup>3</sup>.

#### Beispiel 34

**[0350]** Verhalten von PCA-Pellets in verschiedenen Medien. Dieses Beispiel beschreibt das Verhalten von PCA-Calciumphosphat-Pellets in verschiedenen Medien.

**[0351]** Es wurden vier Arten von Medien ausgewählt:  $\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium); TBS (Tris Bovine Serum: 50 mM Tris + 150 mM NaCl);  $\alpha$ -MEM + FBS (fetales Rinderserum 10%) und Vollmedium (Eintauchen in TBS bei 37°C für 2 h und anschließend Eintauchen in  $\alpha$ -MEM + FBS).

**[0352]** Eine 0,3-g-Probe des Precursorgemisches ACP/DCPD wurde eine Minute mit 7 Tonnen unter Verwendung der Carver Laborpresse komprimiert. Der resultierende Pressling (a) hat einen Durchmesser von 12 mm und eine Höhe von 1 mm. Das Pellet wurde 30 min bei 37°C in 10 ml destilliertes Wasser eingebracht. Nach dem Inkubieren wurde der Pressling 24 und 48 Stunden bei 37°C in 6 ml der verschiedenen Medien eingebracht.

**[0353]** Eine zweite 1-g-Probe des Precursorgemisches ACP/DCPD wurde mit 0,8 ml destilliertem Wasser vermischt. Das Gemisch wurde zum Ball geformt und 30 min bei 37°C in 10 ml destilliertes Wasser getaucht. Der Ball wurde anschließend mit Mörser und Stößel zu einem feinen Pulver zermahlen. Das Pulver wurde dann eine Minute mit 7 Tonnen in der Carver-Laborpresse gepresst. Der resultierende Pressling (b) hat einen Durchmesser von 12 mm und eine Höhe von 1 mm. Anschließend wurde der Pressling 24 und 48 Stunden bei 37°C in verschiedene Medien eingebracht.

**[0354]** Es wurde der pH-Wert der Lösungen (bei 25°C) zu verschiedenen Zeitpunkten (nach 0, 24 und 48 Stunden) nach der Inkubation bei 37°C gemessen. Die Ergebnisse dieser Studie sind in der Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11. pH-Wert der Lösungen

Probe	$\alpha$ -MEM			TBS			$\alpha$ -MEM + FBS			Vollmedium		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
a	7,6	8,1	7,9	7,5	7,0	6,8	7,5	7,7	8,2	7,6	7,9	7,9
b	7,3	7,3	7,1	7,3	6,5	6,0	7,4	7,5	7,5	7,5	7,5	7,3

#### Beispiel 35

**[0355]** Umsetzung von Precursoren, Gefriertrocknung, Zerbröckeln und Pressen. In diesem Beispiel wird beschrieben, wie ein Pellet aus einer PCA-Calciumphosphatpaste hergestellt wird.

**[0356]** PCA wird unter Verwendung von ACP und DCPD als Promotor hergestellt. Als biologisch geeignetes wässriges Medium wird eine Salzlösung verwendet. Die hergestellte PCA-Paste wird dann in vitro bei 37°C

Lyophol-gehärtet und anschließend lyophilisiert. Das erhaltene PCA-Material wird anschließend mit der Hand zerkrümelt. Nach dem Zerbröckeln wird das PCA-Material gemäß den in den Beispielen 32 und 33 beschriebenen Verfahren zu einem Pellet geformt.

#### Beispiel 36

**[0357]** Formen, Härten und Lyophilisieren ohne Vermahlen. Dieses Beispiel zeigt, wie ein Pellet aus einer PCA-Calciumphosphatpaste hergestellt wird. ACP und DCPD werden als Precursoren gewählt. Zur Herstellung der PCA-Paste wird eine geeignete Menge Salzlösung verwendet. Die PCA-Paste wird dann in die gewünschte Form gebracht. Sie wird anschließend in vitro 30 min bei 37°C inkubiert. Der gehärtete Gegenstand wird dann gefriergetrocknet.

#### Beispiel 37

**[0358]** In vivo Experimente, in denen die Verfahren verglichen werden. In diesem Beispiel werden die Verfahren zur Herstellung der Pellets über in vivo Experimente verglichen.

**[0359]** Die Pellets werden gemäß Beispiel 32 hergestellt. Zwei Pellets werden in einen Hunde-Oberschenkelknochen implantiert. Die Tiere werden getötet und die Implantationsstellen nach 3, 4 und 6 Wochen auf verbleibende Materialreste analysiert. Zu jedem Zeitpunkt werden dekalzifizierte und nicht dekalzifizierte Präparate der Implantationsstelle hergestellt und angefärbt. Die Präparate werden histomorphometrisch analysiert, um die Ähnlichkeit der hergestellten Pellets mit der PCA-Calciumphosphatpaste zu ermitteln.

#### Beispiel 38

**[0360]** Einbringen eines Füllmaterials oder Binders. Dieses Beispiel demonstriert die Verwendung eines Füllmaterials zur Untersuchung des plastischen Fließens, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Wirkung auf die Bruchfestigkeit im Pellet gerichtet wurde.

**[0361]** Ein komprimierbarer Zucker wird bei der Pelletherstellung als Füllmaterial verwendet. Der Zucker wird vor der Verdichtung mit den Precursoren ACP und DCPD in einem Verhältnis von 1 : 1 : 1 vermischt. Das Pellet wird gemäß Beispiel 33 hergestellt, wobei Veränderungen hinsichtlich der Dauer des gesamten Kompressionszyklus und der Dauer der maximalen Druckkraft vorgenommen wurden. Die Wirksamkeit des Füllmaterials aus Zucker wird ermittelt, indem die Bruchfestigkeit der Pellets verglichen wird. Zur Berechnung der Bruchfestigkeit wurde die folgende Gleichung verwendet:

$$\sigma_0 = 2F/\pi dt,$$

wobei  $\sigma_0$  die Bruchfestigkeit bedeutet, F die Kraft ist, die erforderlich ist, um den tablettenförmigen Pressling zu spalten, d der Durchmesser des Pellets ist und t die Dicke der Tablette oder Höhe angibt.

#### Beispiel 39

**[0362]** Abgabe eines Impfstoffes aus einem Pellet. Dieses Beispiel zeigt, in welcher Weise das Pellet als Arzneimittelabgabesystem für einen Impfstoff verwendet wird.

**[0363]** Keyhole Limpet-Hämocyanin wird bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml in Phosphat-gepufferter Salzlösung, pH 7,0, hergestellt. 0,8 ml dieser Lösung werden zu 1 g eines 1 : 1-Gemisches von aktiviertem ACP und DCPD gegeben und zu einer Kittmasse vermischt. Die hergestellte PCA-Kittmasse wird dann lyophilisiert. Das trockene Material wird unter Verwendung einer SPEX 8510-Labormühle mit SPEX 8505-Mahlkammer aus Aluminiumoxidkeramik 10 Minuten zermahlen. Das pulverige PCA wird dann, wie in Beispiel 32 beschrieben, zu einem Pellet geformt. Das gemäß Beispiel 32 hergestellte Pellet wird anschließend einer Ratte subkutan implantiert. Das Verfahren wird vier Monate lang monatlich wiederholt. Es wurden regelmäßig Blutproben entnommen und Anti-Keyhole Limpet-Hämocyanin-Antikörpertiter mit ELISA ermittelt.

#### Beispiel 40

**[0364]** In diesem Beispiel wird die Herstellung von PCA-Calciumphosphat unter Verwendung alternativer zweiter Calciumphosphatquellen beschrieben: Sowohl vorgehärtetes PCA-Calciumphosphat als auch kristalliner Hydroxyapatit reagieren mit dem reaktiven amorphen ACP unter Bildung von PCA-Calciumphosphat.

(a) Wenigkristalliner HA wird gemäß der Druckschrift U.S.S.N. 08/554,817 hergestellt, die am 7. November 1995 eingereicht wurde und auf die in der vorliegenden Beschreibung Bezug genommen wird, wobei lediglich Carbonat als Inhibitor verwendet wird (kein  $Mg^{++}$  oder Pyrophosphat). Die resultierenden Pulver werden dann lyophilisiert.

(b) Hydroxyapatit wurde in Pulverform von Adrich Chemicals bezogen (#28,939-6, Lot 00325AQ).

**[0365]** Beide Pulver wurden 1 : 1 mit reaktivem amorphen Calciumphosphat (gemäß Beispiel 5 hergestellt) vermischt und dann mit Wasser angerührt. Beide Gemische härteten bei 37°C innerhalb von 30 Minuten und die IR-Spektren der Reaktionsprodukte entsprechen im Wesentlichen den Spektren des gemäß Beispiel 8 hergestellten PCA-Calciumphosphat.

#### Beispiel 41

**[0366]** In diesem Beispiel wird die Herstellung von partikulärem PCA-Calciumphosphat beschrieben, das in den erfindungsgemäßen Verbundmaterialien verwendet werden kann.

**[0367]** Reaktives amorphes Calciumphosphat und DCPD werden wie in den Beispielen 5 und 8 beschrieben hergestellt, und zur Herstellung von wenigkristallinem Hydroxyapatit, wie in Beispiel 8 beschrieben, verwendet. Das gehärtete PCA-Calciumphosphat wird über Nacht lyophilisiert und in einem Zerkleinerungsgerät pulverisiert und dann ein- oder mehrmals gesiebt, um die gewünschte Partikelgröße zu erhalten. Die Partikel wurden dann in PLGA eingebracht. Es wurden verschiedene Verbundmatrizen folgendermaßen hergestellt:

- (a) PCA-Calciumphosphat mit einer mittleren Partikelgröße von 25 µm (10% wt/wt) in PLGA;
- (b) PCA-Calciumphosphat mit einer mittleren Partikelgröße von 25 µm (5% wt/wt) in PLGA;
- (c) PCA-Calciumphosphat mit einer mittleren Partikelgröße von 100 µm (5% wt/wt) in PLGA; und
- (d) PCA-Calciumphosphat mit einer mittleren Partikelgröße von 200 µm (5% wt/wt) in PLGA.

**[0368]** Die wie oben beschrieben hergestellten Verbundmaterialien werden intramuskulär in Nagetiere eingebracht und die Resorptionsraten werden gemäß Beispiel 16 ermittelt, um zur Verwendung in resorbierbaren biokeramischen Verbundmaterialien geeignete Verbundmaterialien zu identifizieren.

#### Beispiel 42

**[0369]** Dieses Beispiel beschreibt die Herstellung und Überprüfung von resorbierbaren PCA-Calciumphosphat-Verbundmaterialien. Es wird ein PCA-Calciumphosphat/Poly(lactid)-Verbundmaterial in Pastenform, wie in Beispiel 13 oder Beispiel 41 beschrieben, hergestellt. Die Paste wird in Formen in der Gestalt von Marknägeln, Trägerplatten und Schrauben eingebracht. Die Formen werden in einer feuchten Umgebung drei Stunden auf 37°C erwärmt und die gehärteten Gegenstände werden aus der Form genommen. Die Verbundmaterialien wurden gemäß der in Beispiel 19 beschriebenen Vorgehensweise in Tiermodelle implantiert, wobei in allen Fällen sichergestellt wurde, dass der Gegenstand mit knochenbildenden Zellen in Kontakt gekommen ist. Verbundmaterialien, die in weniger als 6 Monaten vollständig resorbiert und ossifiziert sind, sind für die Verwendung als bioresorbierbare biokeramische Verbundimplantate geeignet.

#### Beispiel 43

**[0370]** Dieses Beispiel beschreibt ein resorbierbares Verbundmaterial zur Verwendung als Knochenfüllmaterial oder Knochenzement. Es kann ein PCA-Calciumphosphat/Dextran-Verbundmaterial hergestellt werden, indem zunächst die Paste, wie in Beispiel 8 beschrieben, hergestellt wird. Die Paste kann dann mit 10% (Vol/Vol) polydispersem Dextran vermischt und in einer feuchten Umgebung gehärtet werden. Es kann gezeigt werden, dass sie eine verbesserte Festigkeit und Kompressibilität aufweist. Das gehärtete Verbundmaterial kann dann gemäß Beispiel 19 an einem Tiermodell in einen Bruch eingebracht werden. Es wird die für die Resorption und Reossifizierung benötigte Zeitdauer ermittelt. Das in Beispiel 29 beschriebene Screening wird eingesetzt, um zu bestimmen, ob das Verbundmaterial als resorbierbares biokeramisches Implantat geeignet ist.

#### Beispiel 44

**[0371]** In diesem Beispiel wird die Beschichtung von PCA-Calciumphosphatpartikeln mit einer biologisch abbaubaren äußeren Beschichtung beschrieben. Die auf diese Weise hergestellten Partikel werden im Vergleich mit PCA-Calciumphosphat alleine mit einem anfänglichen Zeitverzug resorbiert und/oder ossifiziert.

**[0372]** Die PCA-Calciumphosphatpartikel können wie in Beispiel 8 beschrieben hergestellt werden. Die Par-

tikel können in einer Reihe von homogenen Chargen mit einer mittleren Partikelgröße im Bereich von 60 bis 100 µm nach dem in Beispiel 11 durchgeführten Verfahren hergestellt werden. Die Partikel können dann gleichförmig mit Poly(lactid) tauchbeschichtet werden. Die beschichteten Partikel werden intramuskulär eingebracht, um die Resorptionskinetik zu bestimmen, die im Vergleich mit unbeschichteten Partikeln verzögert sein kann.

#### Beispiel 45

**[0373]** In diesem Beispiel wird die Verwendung eines PCA-Calciumphosphat/Hydroxyapatit-Verbundmaterials zur Bildung von neuem Knochengewebe beschrieben. Diese Form von Knochengewebe ist für die Augmentationstherapie zweckmäßig.

**[0374]** Kristallines Hydroxyapatit kann in Form von 50–200 µm-Partikeln hergestellt oder erhalten werden. Diese Partikel können in einer Menge von etwa 1–50 Gew.-% in eine PCA-Calciumphosphatpaste eingebracht und gut vermischt werden. Die resultierende Verbundpaste kann in die gewünschte Form gebracht, mit knochenbildenden Zellen angeimpft und angrenzend an den Rindenknochen implantiert und unter Vernähen und Approximation des Weichgewebe fixiert werden. Der Verbund kann auch auf einem Empfänger Knochen eingebracht werden, der gemäß dem in Beispiel 19 beschriebenen Verfahren chirurgisch modelliert wurde. Nach drei Monaten kann die Implantatstelle, wie in Beispiel 19 beschrieben, untersucht werden, um zu ermitteln, ob sich neuer Knochen mit partikulärem Hydroxyapatit in der Form des gebildeten Implantats gebildet hat.

#### Beispiel 46

**[0375]** Dieses Beispiel beschreibt die Bildung eines PCA-Calciumphosphat-Verbundmaterials mit einem Schmierstoff.

**[0376]** Eine PCA-Calciumphosphatpaste kann gemäß Beispiel 8 hergestellt werden. Siliconöl kann mit der Paste in einer Konzentration von 0,1 bis 30 Gew.-% vermischt werden. Bevor die Härtung eintritt, kann die Paste durch eine Injektionsnadel Nr. 16-22 injiziert werden; es hat sich herausgestellt, dass die Injizierbarkeit im Vergleich mit einer unbehandelten Paste deutlich besser ist.

#### Beispiel 47

**[0377]** Dieses Beispiel zeigt die Verwendung eines PCA-Calciumphosphat-Verbundmaterials zur Einbettung eines Gegenstandes in einen Empfänger Knochen. Zusätzlich zum Setzen von Verankerungen können ähnliche Vorgehensweisen eingesetzt werden, um fast jeden gewünschten Gegenstand in einen Empfänger Knochen einzubetten, einschließlich Stäbe und Fasern, bildgebende Stoffe und reibungsvermindernde Substanzen, wie Teflonplatten, wobei die Aufzählung nicht einschränkend zu verstehen ist.

**[0378]** Eine Dacron-Schlinge von etwa 1 mm Durchmesser kann an einer 2 cm-Dacron-Naht gebildet werden. In der Naht kann etwa 2 mm von der Schlinge ein Knoten angebracht werden. Das Nahtmaterial kann dann an dem Knoten getrimmt werden, wodurch eine Schlinge mit einem 2 mm verknoteten Ende übrig bleibt. Ein Loch mit einem Durchmesser von 1 mm kann etwa 3 mm tief in einen Empfänger Knochen gebohrt werden. Das verknotete Ende des Nahtmaterials kann in das Loch eingebracht und das Loch anschließend mit der Calciumphosphatpaste gefüllt werden. Nach sechs Monaten wird die Stelle auf Resorption des PCA-Materials untersucht, um zu ermitteln, ob das Verbundmaterial als resorbierbares biokeramisches Verbundmaterial geeignet ist.

**[0379]** Die Vorgehensweise kann an einem zweiten Subjekt mit der folgenden Modifikation wiederholt werden. Nach dem Anbringen des verknoteten Nahtmaterials in dem Loch kann ein Stopfen aus vorgehärtetem PCA-Calciumphosphat in dem Loch verkeilt werden, wodurch das Nahtmaterial mechanisch gesichert wird. Das Loch kann dann mit einer Paste aus wenigkristallinem Hydroxyapatit verschlossen werden. Nach sechs Monaten wird die Stelle auf die Resorption des PCA-Materials untersucht, um zu ermitteln, ob das Verbundmaterial als resorbierbares biokeramisches Verbundmaterial geeignet ist.

#### Beispiel 48

**[0380]** Wirksamkeitsstudie von PCA an einem Modell (Hund) alveoläre Augmentation/Zahnfach. Dieses Beispiel zeigt die Verwendung des erfindungsgemäßen PCA zur Wiederherstellung von Knochengewebe in einem Zahnfach nach Zahnextraktion beim Hund.

**[0381]** Die Tiere wurden mit Beruhigungsmitteln und Atropin-artigen Wirkstoffen präoperativ behandelt und unter Barbituraten gehalten. Die Lebenszeichen der Tiere (Temperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz) wurden vor und während des Eingriffs überwacht. Das Tier wurde anschließend durch "Toe Pinch" und Hornhaut-Stimulus darauf getestet, ob die Anästhesie geeignet tief war.

**[0382]** Nach hinreichender Anästhesie wurde das Zahnfleischgewebe vorsichtig aus der Umgebung jedes Prämolars entfernt. Die Prämolaren wurden mit einem bei niedriger Geschwindigkeit arbeitenden Dentalbohrer und unter Spülung mit Salzlösung von der oralen Zahnoberfläche zur unteren Oberfläche zwischen den Wurzeln in zwei Hälften gespalten. Jede Zahnhälfte wurde dann fest mit der Extraktionszange gegriffen und vorsichtig, aber fest gedreht, bis der Zahn gelockert war. Die Zahnhälften wurden dann jeweils entfernt. Die Blutung wurde durch Druck und Warten gestoppt. Alle Prämolaren wurden wie beschrieben extrahiert. Nach Entfernen des Zahns und vor dem Anbringen des PCA-Calciumphosphat wurde die lingual-zu-buccal-Alveordicke gemessen und an mindestens drei Stellen aufgezeichnet; diese Messungen wurden nach dem Anbringen des PCA-Calciumphosphat und bei der Autopsie wiederholt und zur Bestimmung des Einwachsens des Knochens verwendet.

**[0383]** Das PCA-Calciumphosphat wurde, wie in Beispiel 11 beschrieben, als Typ 10 hergestellt. Die leeren Zahnfächer/Alveoli befinden sich an einer Seite des Unterkiefers dort, wo früher die Prämolaren waren. Allen Hunden wurde das PCA-Calciumphosphat an einer Seite des Unterkiefers implantiert, wobei die gegenüberliegende Seite als Kontrolle unbehandelt (ungefüllt) blieb. Anschließend wurde das Zahnfleischgewebe in Schichten mit 3-0-Nahtmaterial verschlossen. Nach dem chirurgischen Eingriff wurden die Tiere überwacht, bis sie stabil waren.

**[0384]** Die Heilung der Tiere konnte für vorgegebene Zeitspannen erfolgen. Zwei Hunde wurden nach 3 Wochen und zwei Hunde nach 2 Monaten getötet.

**[0385]** Alle Tiere wurden mit einem kommerziellen, für die Euthanasie verwendeten Produkt (wie Natriumpentobarbital) getötet und die Unterkiefer und die Erkennungszeichen wurden entnommen und in 10% neutralem gepufferten Formalin oder anderen geeigneten Fixativen für decalcifizierte und nicht decalcifizierte Knochen-sektionen konserviert. Die Unterkiefer wurden, wie oben beschrieben, vermessen und geröntgt. Danach wurden die Teststellen für die Histologie entfernt.

**[0386]** Die Implantationsstellen wurden als dekalzifizierte und nicht dekalzifizierte Proben präpariert. Die Präparate wurden auf Biointegration, Biodegradation und Biokompatibilität untersucht.

**[0387]** Eine ähnliche Prozedur wurde an einem einzigen Hund durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das Implantat bioresorbiert wurde und innerhalb von vier Wochen Osseointegration zeigte. Fig. 26 ist ein Bild des histologischen Schnitts des Zahnfachimplantats vier Wochen nach dem chirurgischen Eingriff, das das Ausmaß des Einwachsens des Knochengewebes in das Zahnfach zeigt. Die langen Pfeile geben die Grenze zwischen dem natürlichen Knochen **1** und der Stelle des Implantats **2** an. Es wird auf das übermäßige Einwachsen des Knochengewebes an der Stelle **2** hingewiesen. Das Zahnfleischgewebe ist mit **3** bezeichnet.

#### Beispiel 49

**[0388]** Osteoporotisches Spinalmark. Dieses Beispiel zeigt die für die Behandlung von osteoporotischen Wirbeln durchgeführte Prozedur.

**[0389]** Spinalmark wurde aus der Leiche eines osteoporotischen Patienten erhalten. Injizierbares PCA wurde als Typ 10, wie in Beispiel 11 beschrieben, unter Verwendung von 1,5 ml Wasser auf 1 g PCA als Hydratisierungsmittel hergestellt. Eine Knochenbiopsienadel Nr. 16 (es kann für diesen Zweck auch eine Quantico-Knochen-nadel verwendet werden) wurde in den trabekulären Wirbelknochen (Fig. 27) eingeführt. Eine zweite Nadel Nr. 16 an einer leeren 50-cc-Spritze wurde auf der gegenüberliegenden Seite des gleichen Wirbels eingebracht. Die Einstichstelle der Nadel wurde durch Röntgen bestätigt (Fig. 27). Nach der Lokalisierung der Nadel wurde eine Spritze mit frisch hydratisiertem PCA an der Knochenbiopsienadel befestigt. Das PCA-Calciumphosphat wurde langsam mit der Biopsienadel aus der Spritze injiziert, wobei gleichzeitig die Nadel langsam zurückgezogen und über die 50 cc-Spritze leicht angesaugt wurde. Das injizierte PCA ist im Vergleich mit dem osteoporotischen Wirbel vor der Implantation (Fig. 28a) als elektronendichter Bereich im Wirbel in den Röntgenbildern in Fig. 28b zu sehen. Dieses Ergebnis bestätigt die Injizierbarkeit einer erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphatpaste in das Spinalmark eines osteoporotischen Patienten.

**[0390]** Lumbale interkorporelle Wirbelsäulenfusion am Hund. In diesem Beispiel wird die Verwendung von PCA-Calciumphosphat bei der Fusion von spinalen Vertebrae am Hund beschrieben.

**[0391]** Die Tiere wurden anästhesiert, auf die rechte Seite gelegt und, von vorne nach hinten auf der Mittellinie von der Thoraxmitte zum Becken geschoren. Nach dem sterilen Abdecken wurde ein retroperitonealer Eingriff zur vorderen Lendenwirbelsäule durchgeführt, wobei die L3-L6-Vertebrae freigelegt wurden. Die segmentären Gefäße über L4 und L5 wurden abgebunden und geteilt, so dass die L3-4-, L4-5- und L5-6-Bandscheiben anterolateral freigelegt wurden. Nach der Diskektomie wurde ein zylindrischer Titankäfig in jede Bandscheibenlücke eingebracht, der entweder PCA-Calciumphosphat oder autologes Knochengewebe enthielt oder leer war. Aus dem linken vorderen Beckenkamm wurde ein autogener Beckenkammknochenspan über einen getrennten Schnitt gewonnen, kurz bevor er in den Käfig gegeben und in die Bandscheibenlücke eingebracht wurde. Nachdem alle drei Käfige eingebracht waren, wurde unter Verwendung von 4,5-mm-Vertebralkörperschrauben und einem Draht (6 mm Durchmesser) von L3 nach L6 fixiert. Anschließend wurde die abdominale Wunde und die Stelle der Entnahme am Beckenkamm schichtweise unter Verwendung von absorbierbarem Nahtmaterial und Hautklammern geschlossen.

**[0392]** Die Hunde wurden zwei und zwölf Wochen später getötet und die Histologie der nicht decalcifizierten Sektionen wurde auf neues Knochenwachstum und vertebrale Fusion untersucht. Durch visuelle Inspektion schien bei Verwendung des erfindungsgemäßen PCA-Calciumphosphat eine Fusion des Rückenmarks vorhanden zu sein.

#### Weitere Ausführungsformen

**[0393]** Der vorstehende Text ist lediglich als Beschreibung von einigen bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsformen zu verstehen und soll nicht einschränkend gewertet werden. Die nachfolgenden Ansprüche umfassen alle allgemeinen und speziellen Merkmale der Erfindung, die hier im Text und den beigegeführten Zeichnungen beschrieben sind.

#### Patentansprüche

1. Biokompatible keramische Zusammensetzung zur Herstellung einer selbsthärtenden Calciumphosphatpaste, die das folgende Gemisch enthält:

- (a) ein amorphes Calciumphosphat mit einem Calcium/Phosphat-Verhältnis (Ca : P) von 1,1 : 1,0 bis 1,9 : 1,0;
- (b) einen Calciumphosphat-Promotor, der die Umwandlung des amorphen Calciumphosphat in ein wenigkristallines apatitisches (PCA, poorly crystalline apatitic) Calciumphosphat fördert; und
- (c) ein ergänzendes Material, das unter den bioresorbierbaren Polymeren, bioaktiven Gläsern, nicht bioresorbierbaren Materialien, Schmierstoffen, Bindemitteln und radiographischen Materialien ausgewählt ist; und die befähigt ist, in einer endothermen Reaktion wenigkristallines apatitisches (PCA) Calciumphosphat zu bilden, wenn sie in einer Menge, die ausreichend ist, um eine selbsthärtende Paste bereitzustellen, die eine injizierbare oder verformbare Konsistenz hat, mit einem physiologisch verträglichen, flüssigen Träger vermischt wird.

2. Biokompatible keramische selbsthärtende Calciumphosphatpaste, die enthält:

- (a) ein amorphes Calciumphosphat mit einem Calcium/Phosphat-Verhältnis (Ca : P) von 1,1 : 1,0 bis 1,9 : 1,0;
- (b) einen Calciumphosphat-Promotor, der die Umwandlung des amorphen Calciumphosphat in ein wenigkristallines apatitisches (PCA) Calciumphosphat fördert; und
- (c) ein ergänzendes Material, das unter den bioresorbierbaren Polymeren, bioaktiven Gläsern, nicht bioresorbierbaren Materialien, Schmierstoffen, Bindemitteln und radiographischen Materialien ausgewählt ist, und
- (d) einen physiologisch verträglichen, flüssigen Träger in einer Menge, die ausreichend ist, um eine Paste mit injizierbarer oder verformbarer Konsistenz bereitzustellen, wobei das Härten der Paste mit einer endothermen Reaktion und der Umwandlung des amorphen Calciumphosphat in das wenigkristalline apatitische (PCA) Calciumphosphat verbunden ist.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei die Paste bei 25°C während einer Zeitspanne, die größer als 10 Minuten ist, injizierbar bleibt und bei 37°C in 10 bis 60 Minuten härtet.

4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Calciumphosphat-Promotor ein saures Calciumphosphat ist, das beispielsweise unter Calciummetaphosphat, Dicalciumphosphat-Dihydrat, Heptacal-



ciumdecaphosphat, Tricalciumphosphat, Calciumpyrophosphat-Dihydrat, kristallinem Hydroxyapatit, Calciumpyrophosphat, Monetit, Octacalciumphosphat und wenigkristallinem apatitischem (PCA) Calciumphosphat ausgewählt ist.

5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Calcium/Phosphat-Verhältnis (Ca : P) insgesamt weniger als 1,5 : 1,0 beträgt.

6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Calciumphosphat-Promotor Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD) umfasst, wobei das Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD) beispielsweise eine mittlere Korngröße unter 200 µm und vorzugsweise unter 95 µm aufweist oder das Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD) eine mittlere Korngröße von 35 bis 45 µm und eine maximale Korngröße unter 110 µm aufweist.

7. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die physiologisch verträgliche Flüssigkeit unter Wasser, pH-gepufferten Lösungen, Salzlösungen, Seren und Gewebekulturbedien ausgewählt ist.

8. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das ergänzende Material ein bioresorbierbares Polymer ist, das unter Collagen, einer entmineralisierten Knochenmatrix, Hyaluronsäure und deren Derivaten, Polyanhydriden, Polyorthoestern, Polyglykolsäure, Polymilchsäure und Copolymeren mit Polyglykolsäure und/oder Polymilchsäure, Polyestern von α-Hydroxycarbonsäuren, Polyanhydriden, Polyhydroxybutyrat, Poly(anhydrid-coimid) und Copolymeren dieser Verbindungen und bioaktiven Glaszusammensetzungen ausgewählt ist.

9. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das ergänzende Material ein nicht bioresorbierbares Material ist, das unter Dextranen, Polyethylen, Polymethylmethacrylat (PMMA), Kohlenstoff-Fasern, Polyvinylalkohol (PVA), Poly(ethylenterephthalat)-polyamid, Glas, Calciumsulfat und Calciumphosphaten ausgewählt ist, oder

wobei das ergänzende Material ein Schmierstoff ist, der unter Siliconölen, Polymerwachsen, Lipiden und Fettsäuren ausgewählt ist, oder

wobei das ergänzende Material in einer Form vorliegt, die unter Schaumstoff, Schwämmen, Netzen, Partikeln, Fasern, Gelen und Filamenten ausgewählt ist.

10. Verfahren zur Herstellung einer biokompatiblen, keramischen, selbsthärtenden Calciumphosphatpaste, wobei das Verfahren zur Herstellung einer Paste umfasst, in beliebiger Reihenfolge zu vermischen:

(a) ein amorphes Calciumphosphat mit einem Calcium/Phosphat-Verhältnis (Ca : P) von 1,1 : 1,0 bis 1,9 : 1,0;

(b) einen Calciumphosphat-Promotor, der die Umwandlung des amorphen Calciumphosphat in ein wenigkristallines apatitisches (PCA) Calciumphosphat fördert;

(c) ein ergänzendes Material, das unter den bioresorbierbaren Polymeren, bioaktiven Gläsern, nicht bioresorbierbaren Materialien, Schmierstoffen, Bindemitteln und radiographischen Materialien ausgewählt ist; und

(d) einen physiologisch verträglichen, flüssigen Träger in einer Menge, die ausreichend ist, um eine Paste mit injizierbarer oder verformbarer Konsistenz bereitzustellen,

wobei die Paste unter Bildung eines bioresorbierbaren, wenigkristallinen apatitischen (PCA) Calciumphosphat in einer endothermen Reaktion härtet.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Paste bei 25°C länger als 10 Minuten injizierbar bleibt und bei 37°C in 10 bis 60 Minuten härtet.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 und 11, wobei der Calciumphosphat-Promotor ein saurer Calciumphosphat-Promotor ist, der beispielsweise unter Calciummetaphosphat, Dicalciumphosphat-Dihydrat, Heptacalciumdecaphosphat, Tricalciumphosphat, Calciumpyrophosphat-Dihydrat, kristallinem Hydroxyapatit, Calciumpyrophosphat, Monetit, Octacalciumphosphat und wenigkristallinem apatitischem (PCA) Calciumphosphat ausgewählt ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei das Calcium/Phosphat-Verhältnis (Ca : P) insgesamt weniger als 1,5 : 1,0 beträgt.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, wobei der Calciumphosphat-Promotor Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD) umfasst, wobei das Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD) beispielsweise eine mittlere Korngröße unter 200 µm und vorzugsweise unter 95 µm aufweist oder das Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD) eine mittlere Korngröße von 35 bis 45 µm und eine maximale Korngröße unter 110 µm aufweist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, wobei die physiologisch verträgliche Flüssigkeit unter Wasser, pH-gepufferten Lösungen, Salzlösungen, Seren und Gewebekulturmedien ausgewählt ist.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 15, wobei das ergänzende Material ein bioresorbierbares Polymer ist, das unter Collagen, einer entmineralisierten Knochenmatrix, Hyaluronsäure und deren Derivaten, Polyanhydriden, Polyorthoestern, Polyglykolsäure, Polymilchsäure und Copolymeren mit Polyglykolsäure und/oder Polymilchsäure, Polyestern von  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren, Polyanhydriden, Polyhydroxybutyrat, Poly(anhydrid-co-imid) und Copolymeren dieser Verbindungen und bioaktiven Glaszusammensetzungen ausgewählt ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 15, wobei das ergänzende Material ein nicht bioresorbierbares Material ist, das unter Dextranen, Polyethylen, Polymethylmethacrylat (PMMA), Kohlenstoff-Fasern, Polyvinylalkohol (PVA), Poly(ethylenterephthalat)-polyamid, Glas, Calciumsulfat und Calciumphosphaten ausgewählt ist, oder  
wobei das ergänzende Material ein Schmierstoff ist, der unter Siliconölen, Polymerwachsen, Lipiden und Fettsäuren ausgewählt ist, oder  
wobei das ergänzende Material in einer Form vorliegt, die unter Schaumstoff, Schwämmen, Netzen, Partikeln, Fasern, Gelen und Filamenten ausgewählt ist.
18. Kit enthaltend:  
(a) ein Gemisch aus einem amorphen Calciumphosphat mit einem Calcium/Phosphat-Verhältnis (Ca : P) von 1,1 : 1,0 bis 1,9 : 1 und einem Calciumphosphat-Promotor, der die Umwandlung des amorphen Calciumphosphat in ein wenigkristallines apatitisches (PCA) Calciumphosphat fördert, in Pulverform;  
(b) ein ergänzendes Material, das unter den bioresorbierbaren Polymeren, bioaktiven Gläsern, nicht bioresorbierbaren Materialien, Schmierstoffen, Bindemitteln und radiographischen Materialien ausgewählt ist, wobei das ergänzende Material entweder getrennt von dem pulverförmigen Gemisch oder zusammen mit dem pulverförmigen Gemisch bereitgestellt wird; und  
(c) einen physiologisch akzeptablen flüssigen Träger,  
wobei das pulverförmige Gemisch, das ergänzende Material und der flüssige Träger unter Bildung einer selbsthärtenden Calciumphosphatpaste vermischt werden können, wobei die Paste unter Bildung eines wenigkristallinen apatitischen (PCA) Calciumphosphat in einer endothermen Reaktion härtet.
19. Kit nach Anspruch 18, wobei der Calciumphosphat-Promotor ein saures Calciumphosphat ist, das beispielsweise unter Calciummetaphosphat, Dicalciumphosphat-Dihydrat, Heptacalciumdecaphosphat, Tricalciumphosphat, Calciumpyrophosphat-Dihydrat, kristallinem Hydroxyapatit, Calciumpyrophosphat, Monetit, Octacalciumphosphat und wenigkristallinem apatitischem (PCA) Calciumphosphat ausgewählt ist.
20. Kit nach Anspruch 18 und 19, wobei das Calcium/Phosphat-Verhältnis (Ca : P) insgesamt weniger als 1,5 : 1,0 beträgt.
21. Kit nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei der Calciumphosphat-Promotor Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD) umfasst, wobei das Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD) beispielsweise eine mittlere Korngröße unter 200  $\mu\text{m}$  und vorzugsweise unter 95  $\mu\text{m}$  aufweist oder das Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD) eine mittlere Korngröße von 35 bis 45  $\mu\text{m}$  und eine maximale Korngröße unter 110  $\mu\text{m}$  aufweist.
22. Kit nach einem der Ansprüche 18 bis 21, wobei die physiologisch verträgliche Flüssigkeit unter Wasser, pH-gepufferten Lösungen, Salzlösungen, Seren und Gewebekulturmedien ausgewählt ist.
23. Kit nach einem der Ansprüche 18 bis 22, wobei das ergänzende Material ein bioresorbierbares Polymer ist, das unter Collagen, einer entmineralisierten Knochenmatrix, Hyaluronsäure und deren Derivaten, Polyanhydriden, Polyorthoestern, Polyglykolsäure, Polymilchsäure und Copolymeren mit Polyglykolsäure und/oder Polymilchsäure, Polyestern von  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren, Polyanhydriden, Polyhydroxybutyrat, Poly(anhydrid-co-imid) und Copolymeren dieser Verbindungen und bioaktiven Glaszusammensetzungen ausgewählt ist.
24. Kit nach einem der Ansprüche 18 bis 22, wobei das ergänzende Material ein nicht bioresorbierbares Material ist, das unter Dextranen, Polyethylen, Polymethylmethacrylat (PMMA), Kohlenstoff-Fasern, Polyvinylalkohol (PVA), Poly(ethylenterephthalat)-polyamid, Glas, Calciumsulfat und Calciumphosphaten ausgewählt ist, oder  
wobei das ergänzende Material ein Schmierstoff ist, der unter Siliconölen, Polymerwachsen, Lipiden und Fettsäuren ausgewählt ist, oder

wobei das ergänzende Material in einer Form vorliegt, die unter Schaumstoff, Schwämmen, Netzen, Partikeln, Fasern, Gelen und Filamenten ausgewählt ist.

25. Verwendung der Zusammensetzung oder Paste nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder des Kit nach einem der Ansprüche 18 bis 24 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Knochendefekten, wobei das Arzneimittel an dem Ort des Knochendefekts eingebracht wird.

26. Verwendung der Zusammensetzung oder Paste nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder des Kit nach einem der Ansprüche 18 bis 24 für die Herstellung eines Arzneimittels, um an einem Implantationsort eine Prothese einzubetten, wobei die Prothese mit dem Arzneimittel in Kontakt gebracht wird, bevor oder nachdem sie an dem Implantationsort eingebracht wurde.

27. Verwendung der Zusammensetzung oder Paste nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder des Kit nach einem der Ansprüche 18 bis 24 zur Herstellung eines Arzneimittels, um ein ergänzendes Material an einem Implantationsort einzubetten, wobei das Arzneimittel an dem Implantationsort eingebracht wird.

Es folgen 19 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen



FIG. 1

	O	P	CA	TOTAL
AVG	68.51	12.23	19.26	100.00
+-	0.80	0.11	0.11	COUNT
+-	0.56	0.18	0.39	1-SIGMA
+-	0.40	0.13	0.28	95% CONF

LT= 60 SECS  
ACP-H

CA/P-Verhältnis 1.575

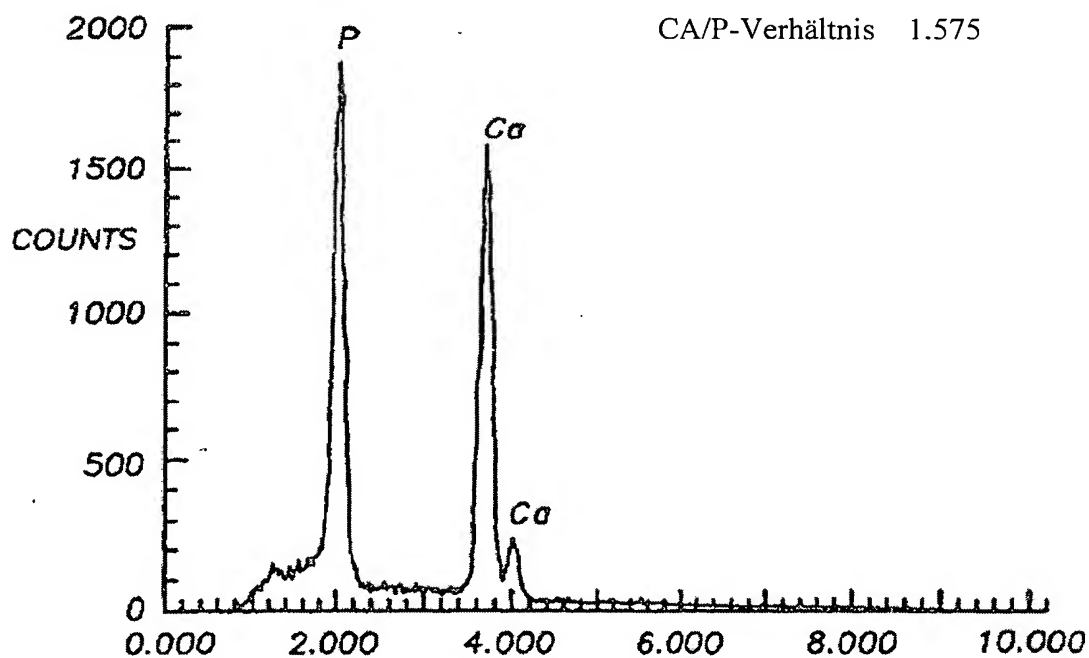


FIG. 2

ENERGIE (keV)

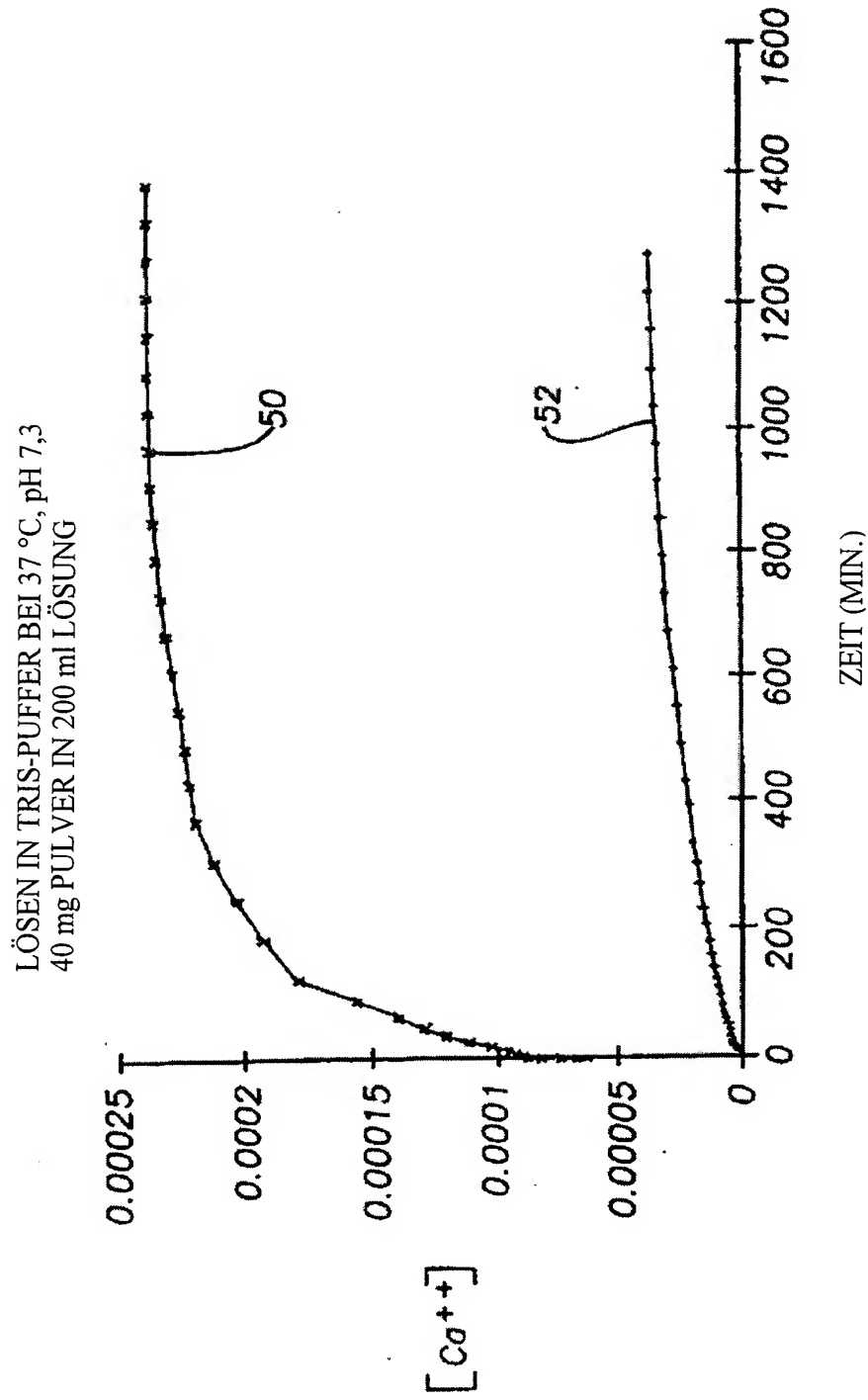


FIG. 3

REAKTIVES ACP

INTENSITÄT

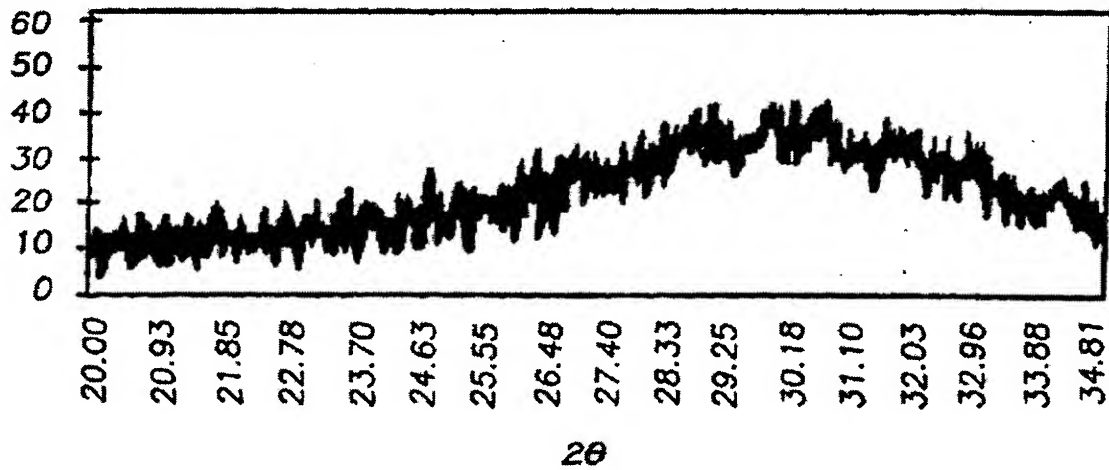
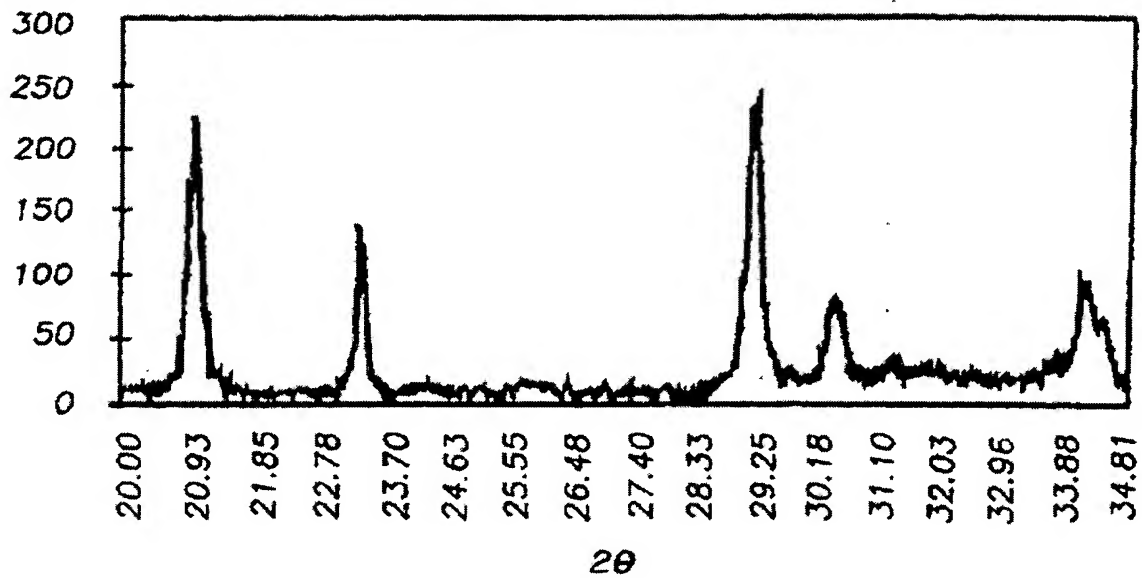


FIG. 4A

DCPD

INTENSITÄT



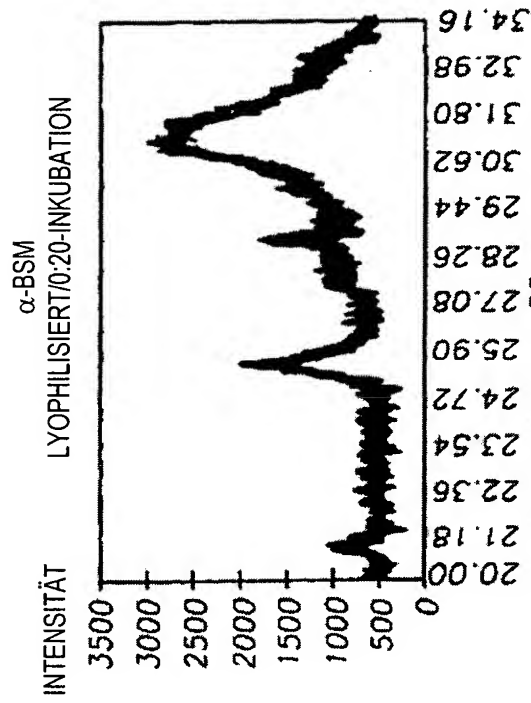


FIG.5B

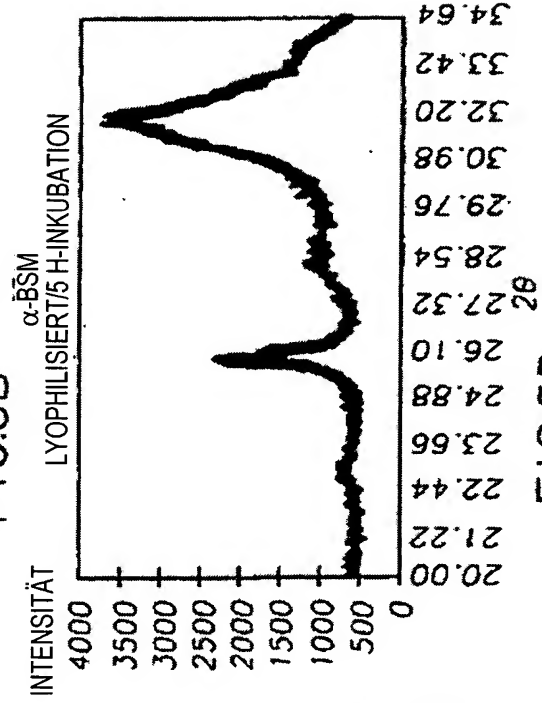


FIG.5D

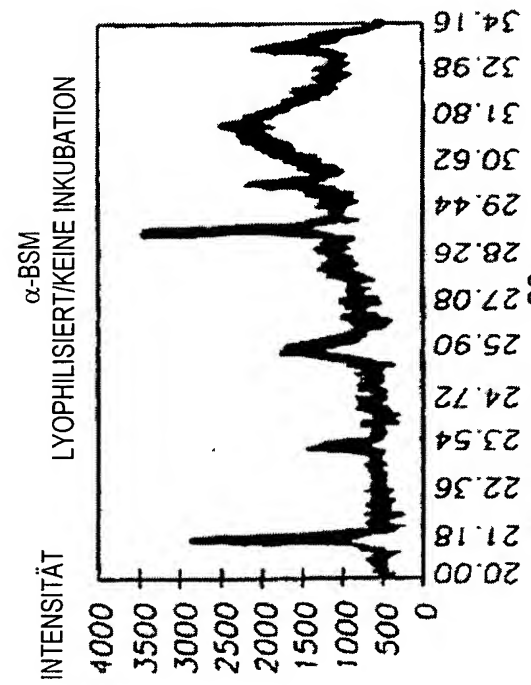


FIG.5A

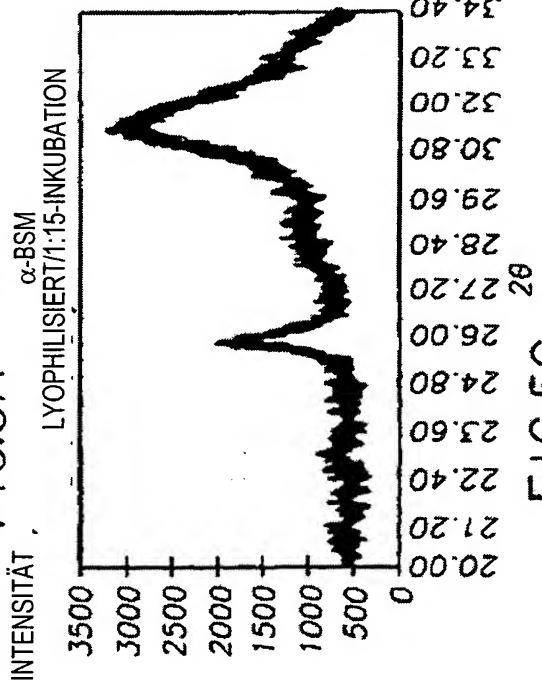
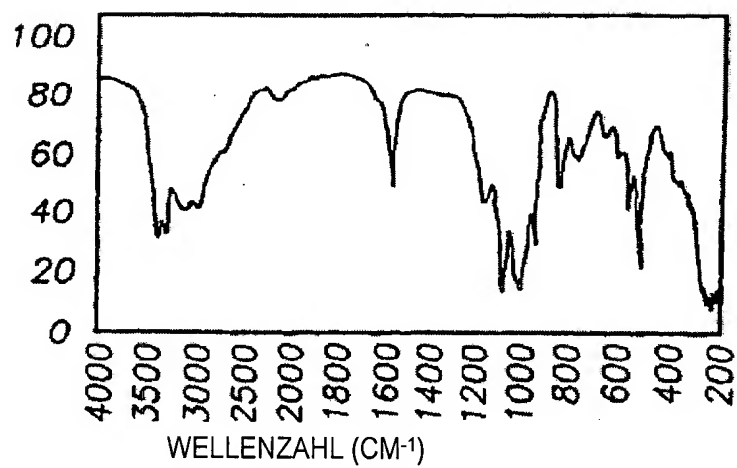


FIG.5C



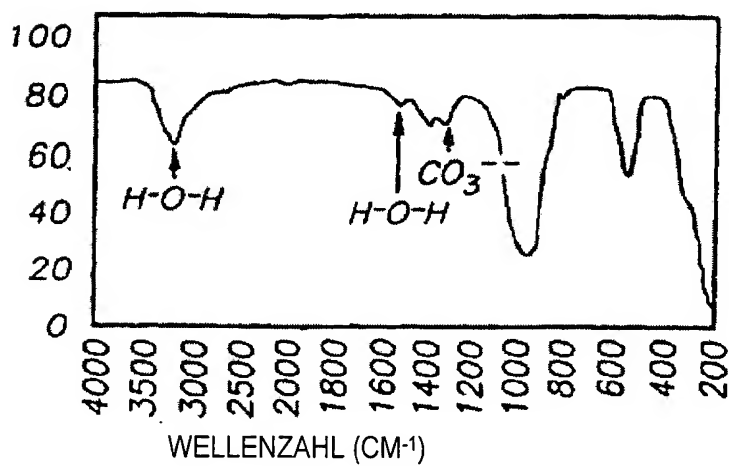
TRANSMISSION (%)

FIG. 6A



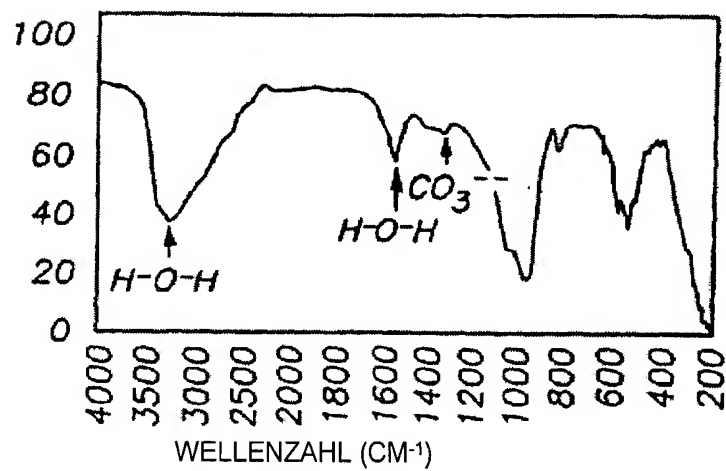
TRANSMISSION (%)

FIG. 6B



TRANSMISSION (%)

FIG. 6C



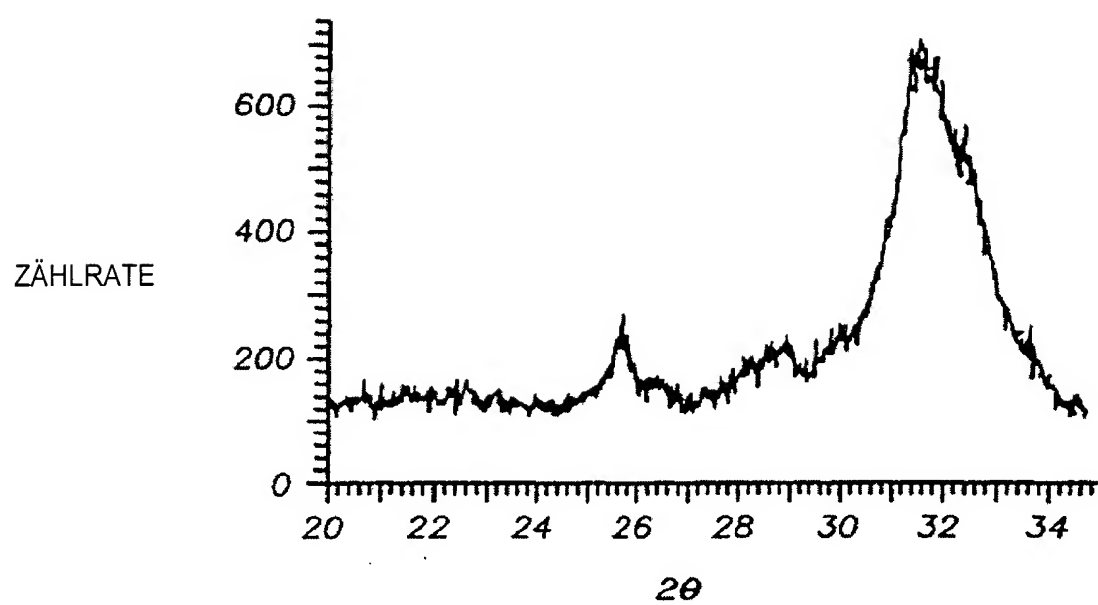


FIG. 7

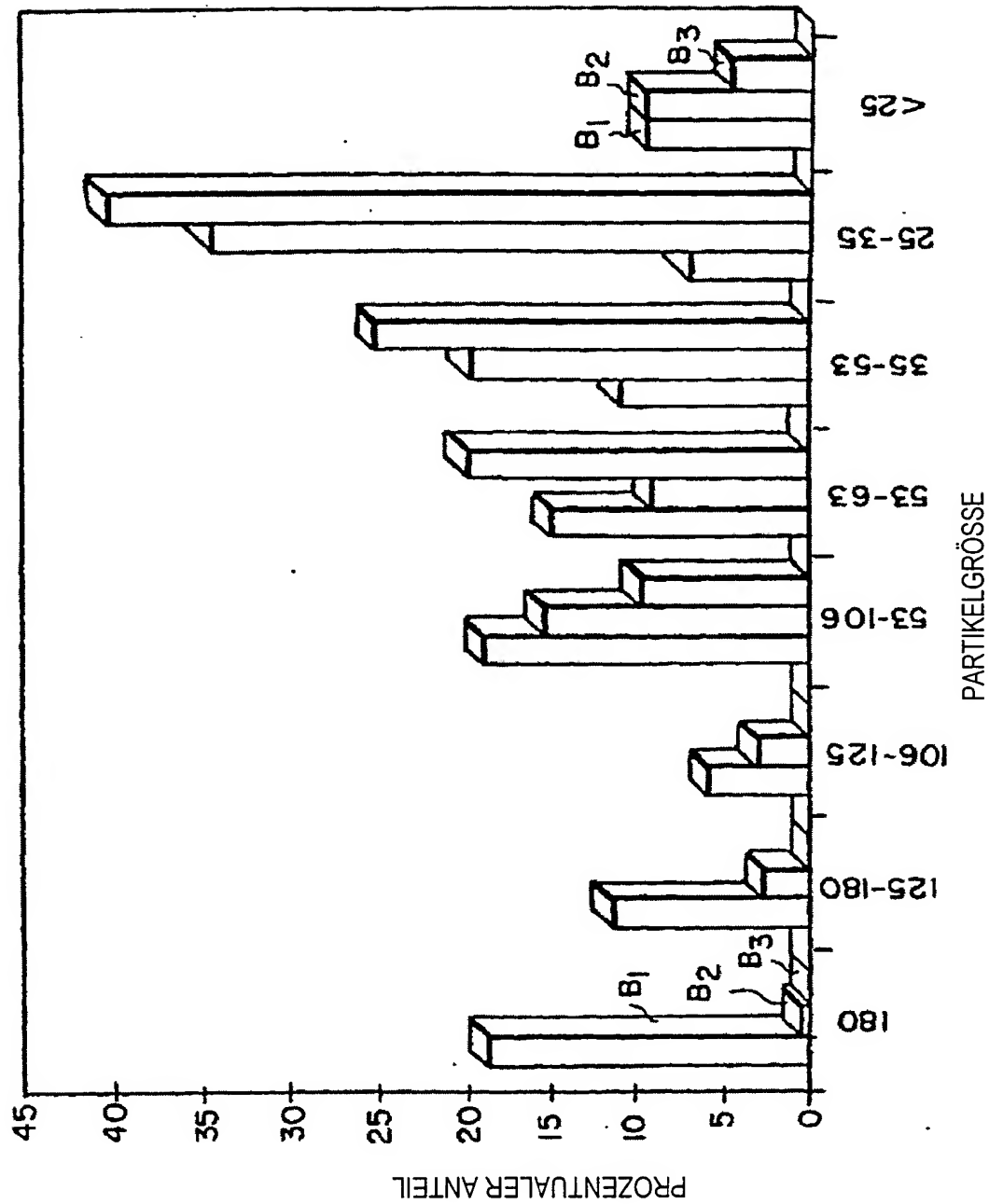


FIG.8

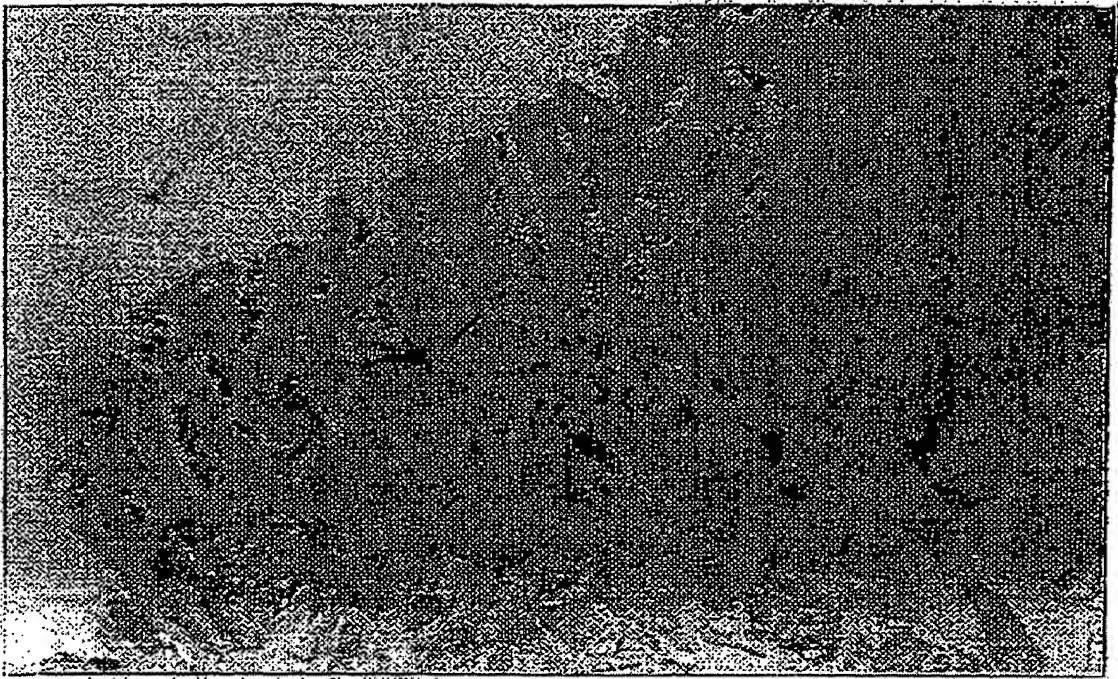


FIG. 9A

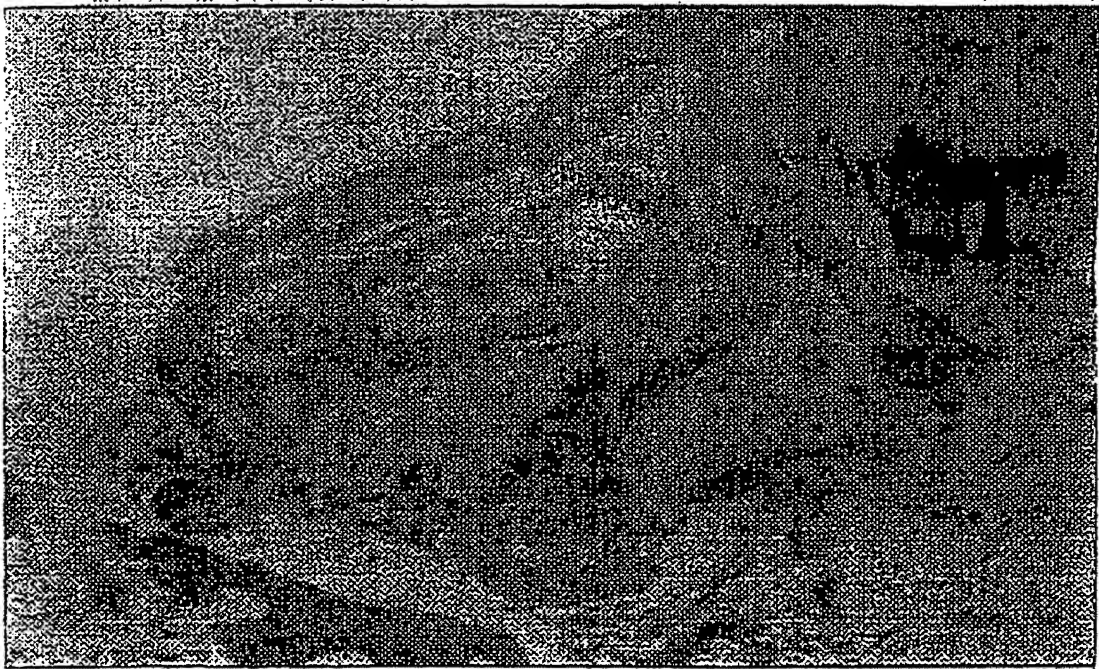


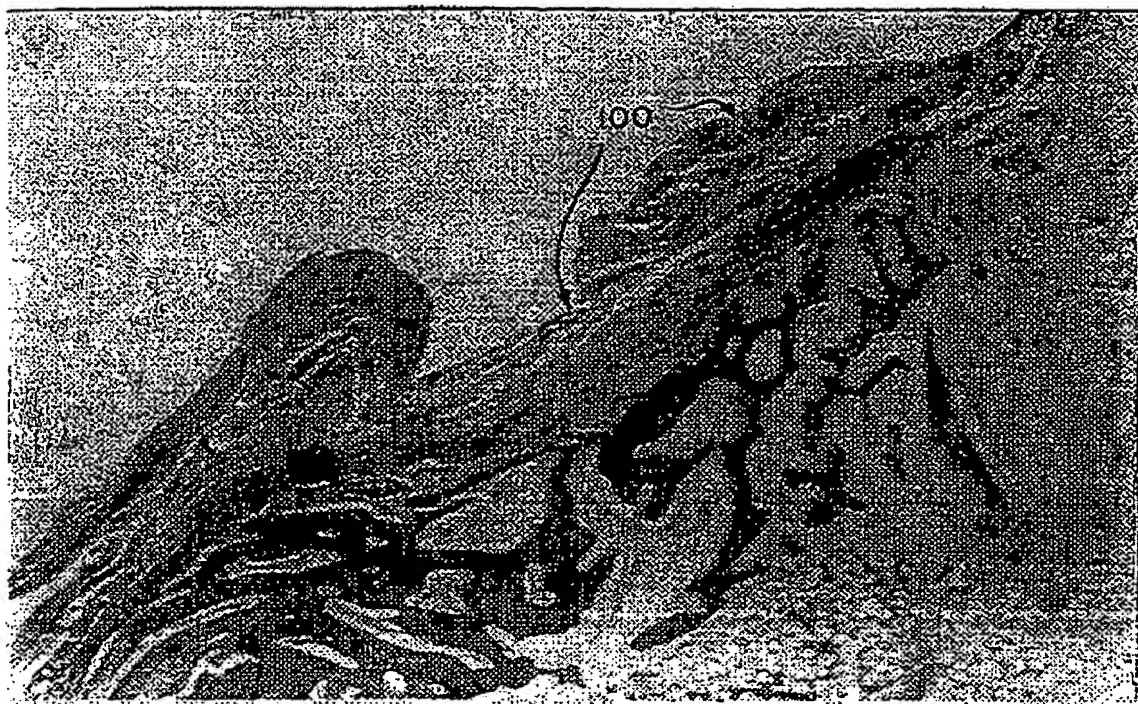
FIG. 9B



FIG. 10



FIG. 11



102

FIG. 12A

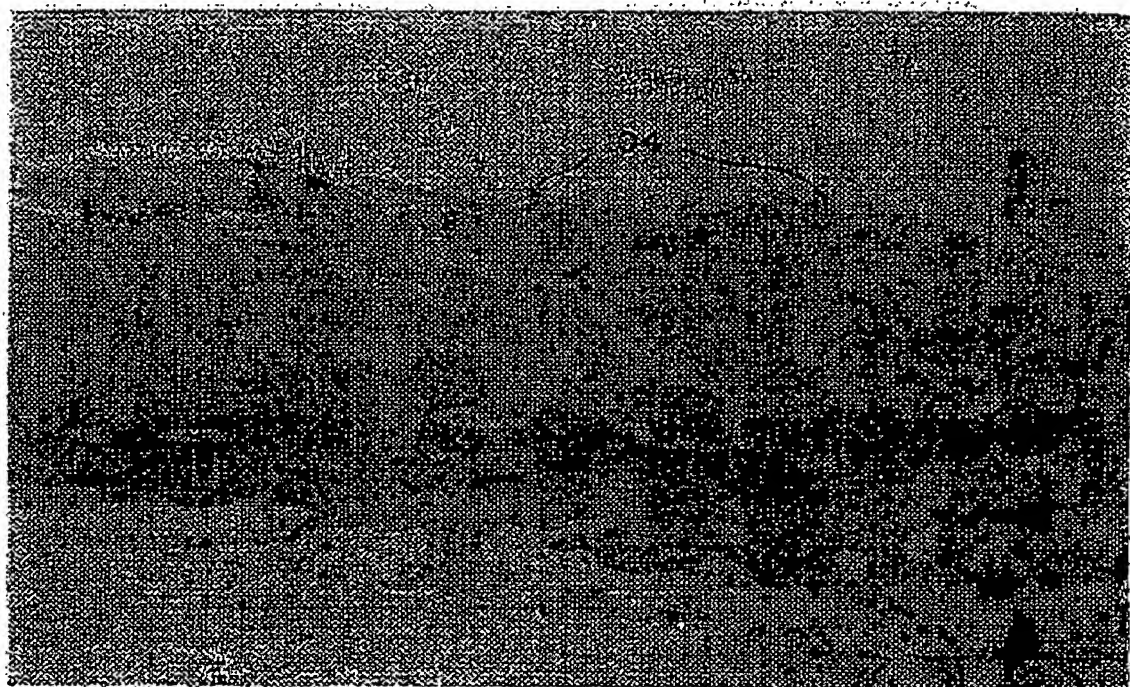
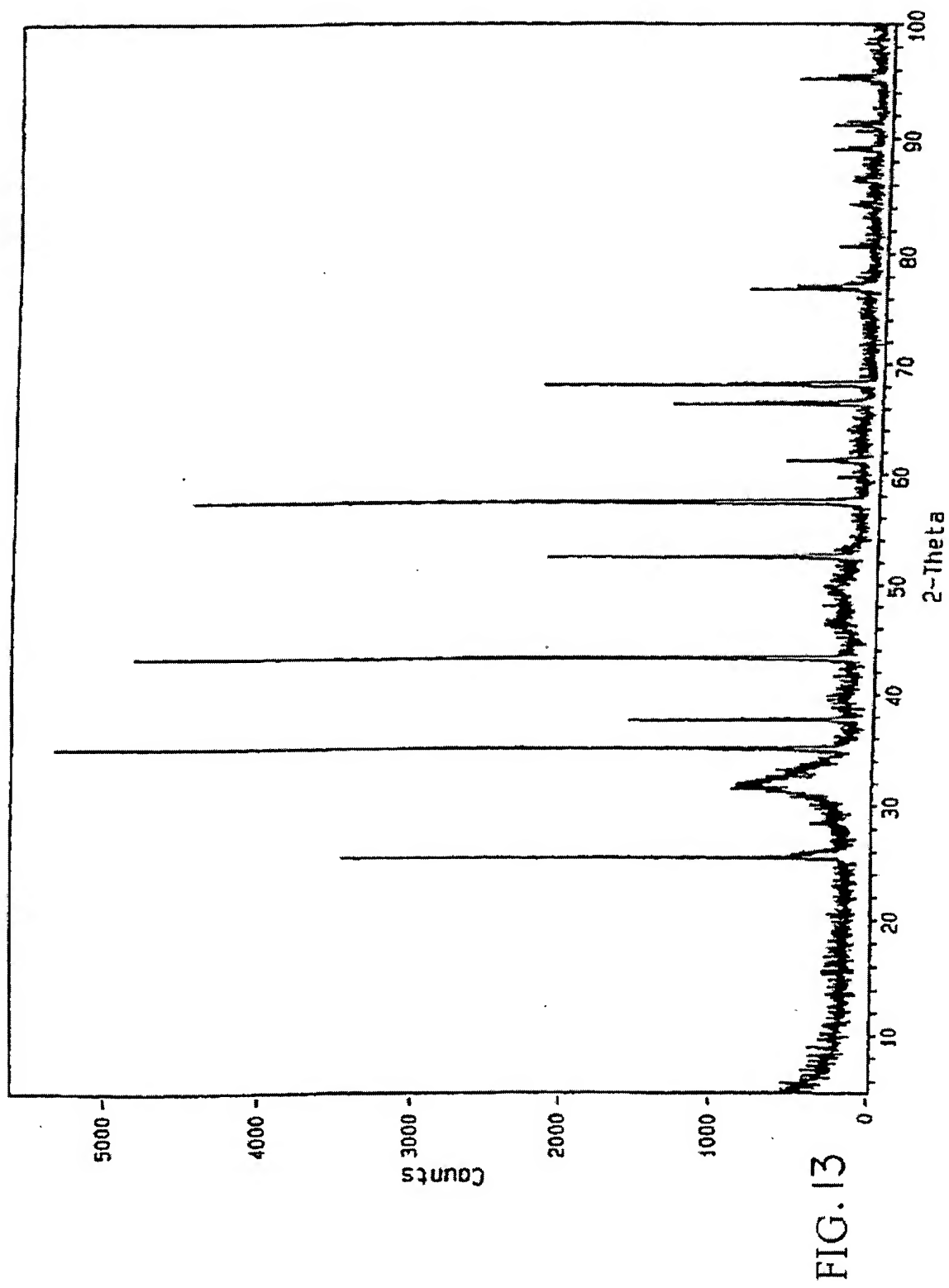
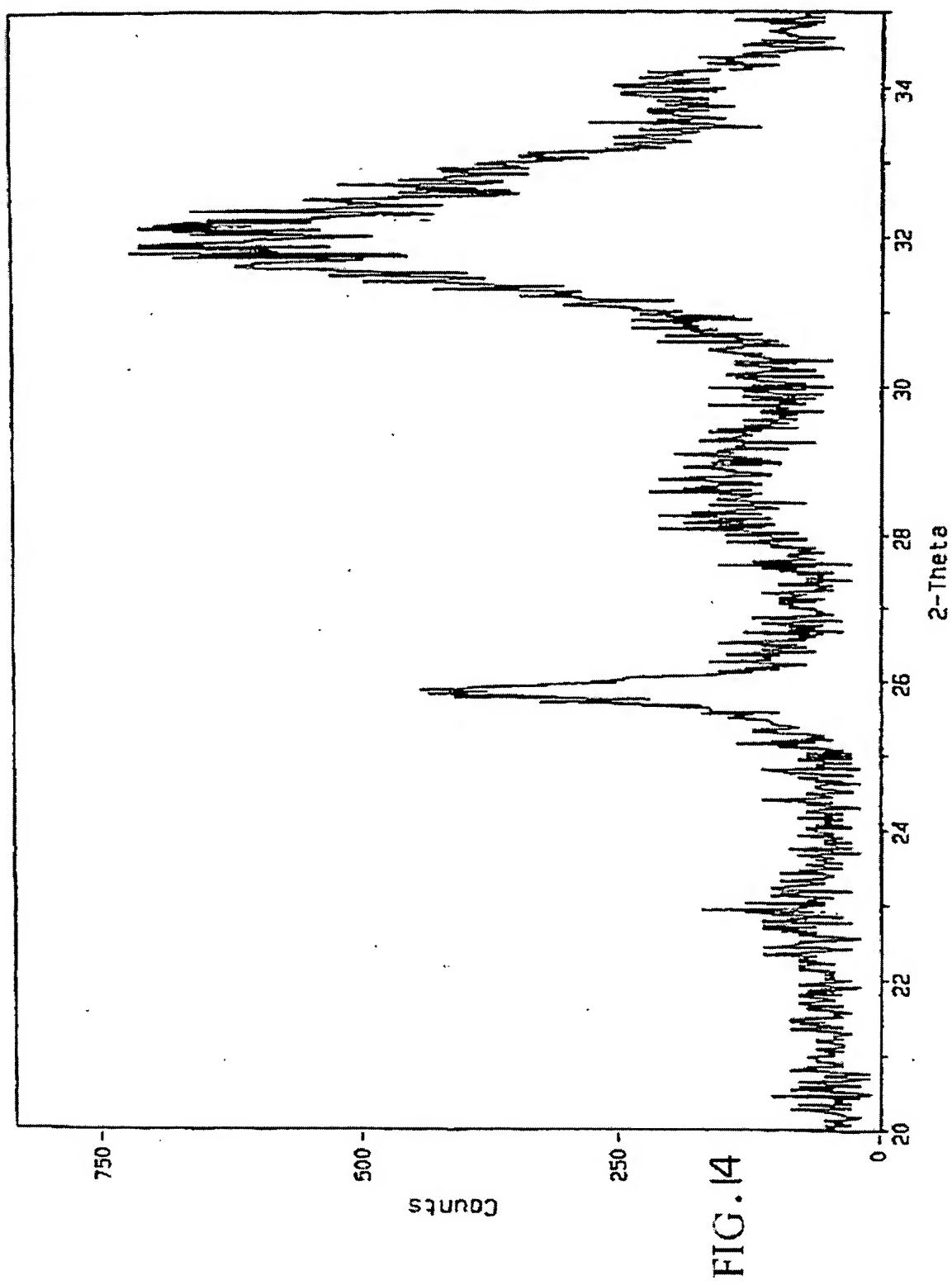
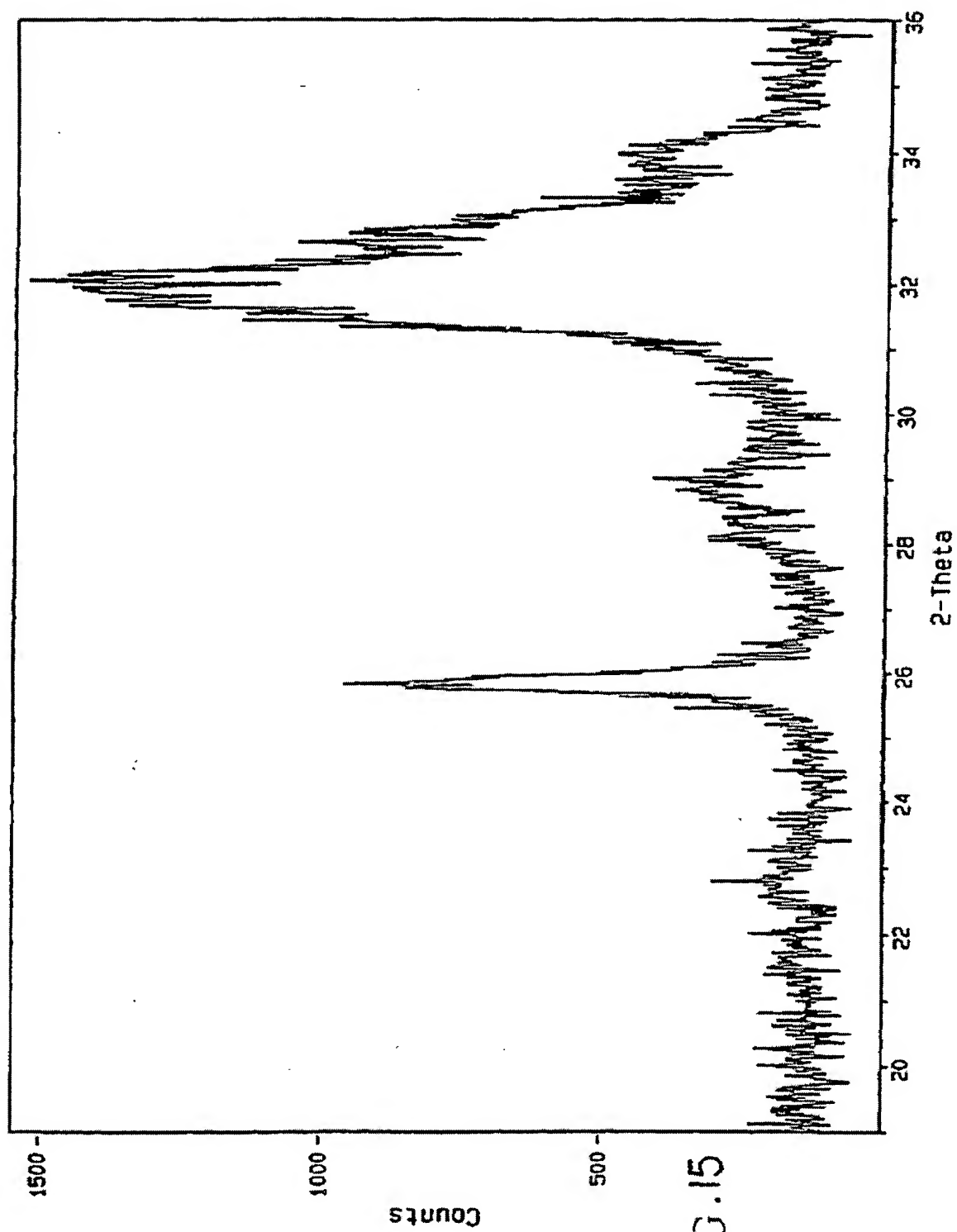


FIG. 12B









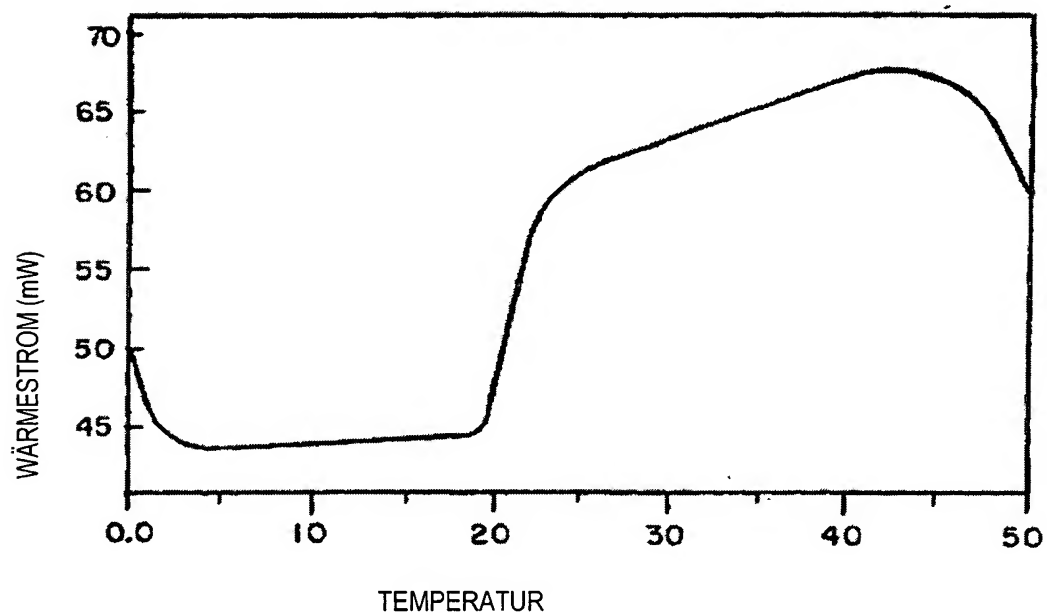
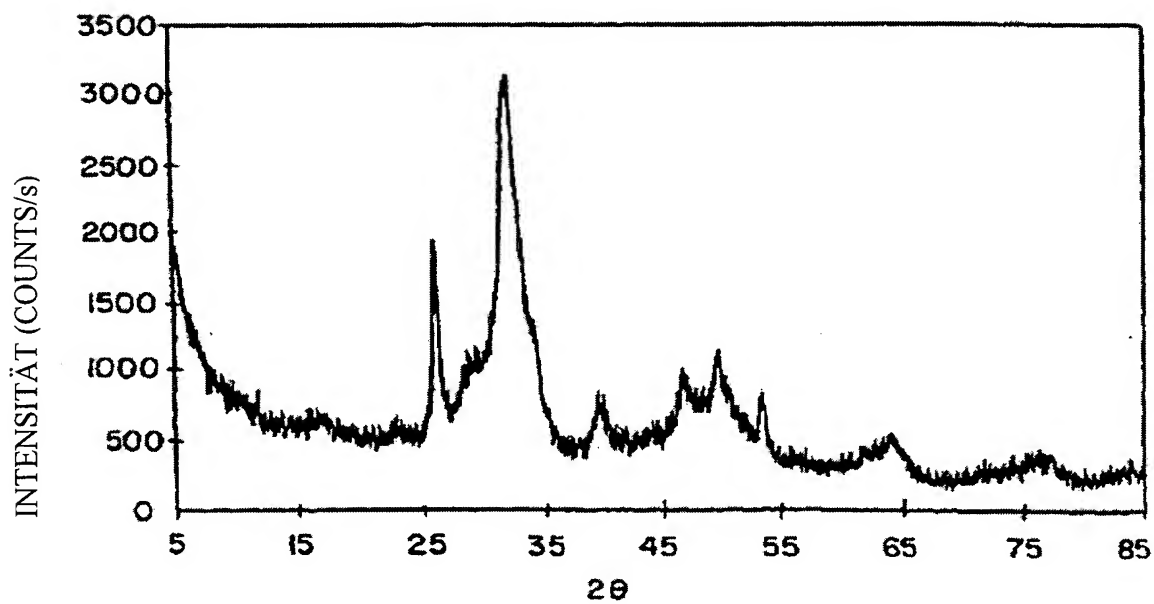
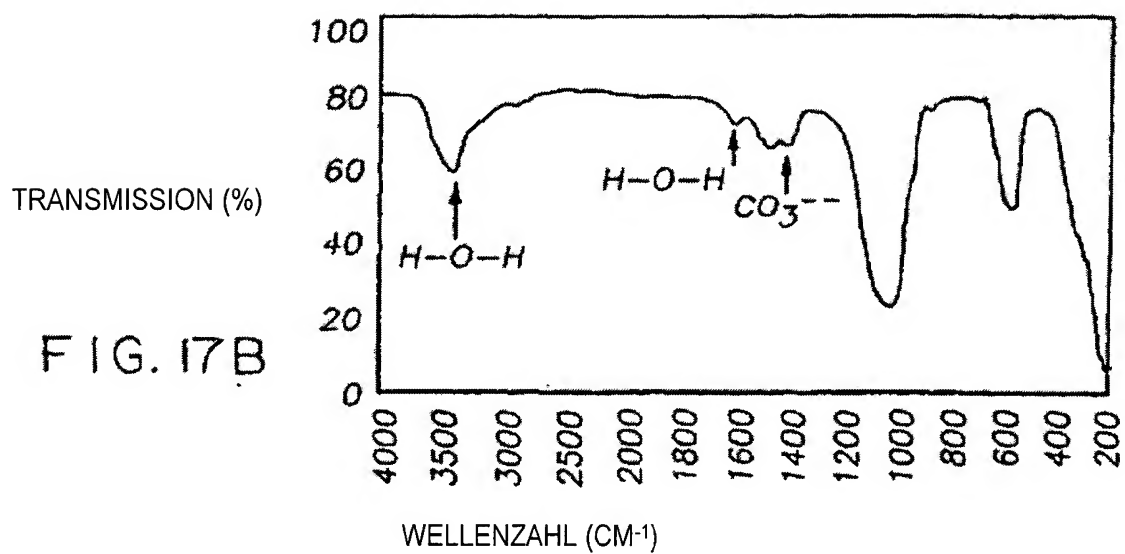
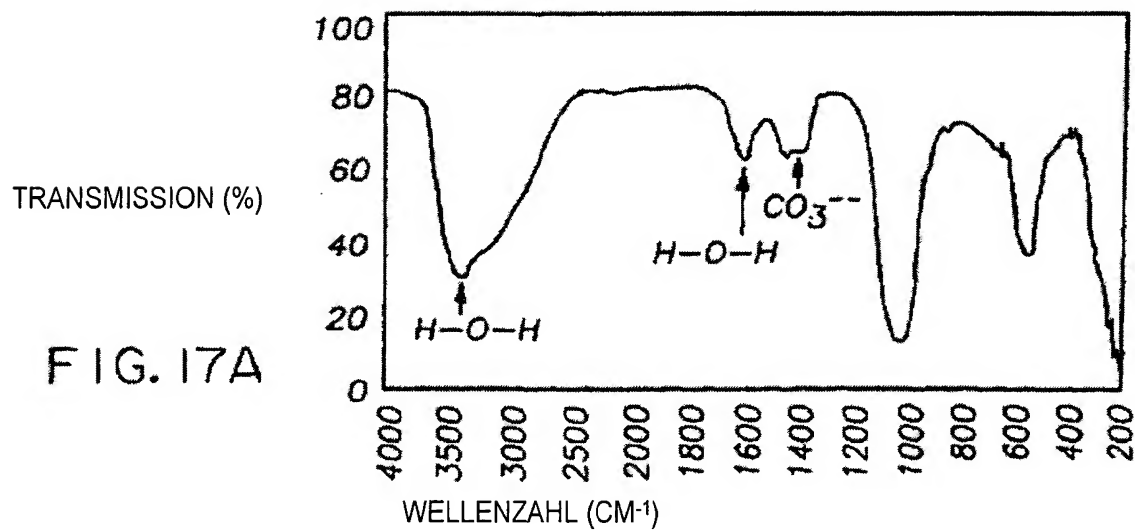


FIG. 16





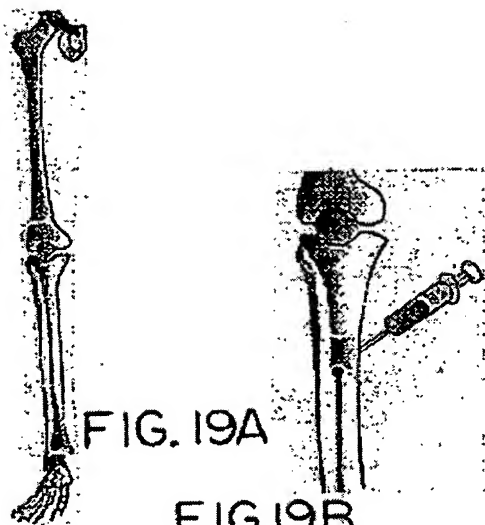


FIG. 19A

FIG. 19B

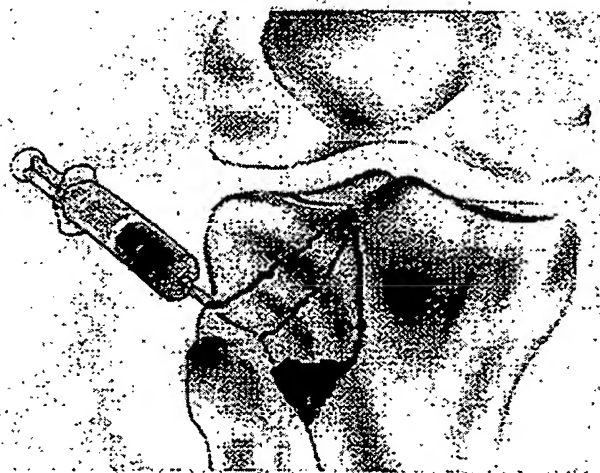


FIG. 20

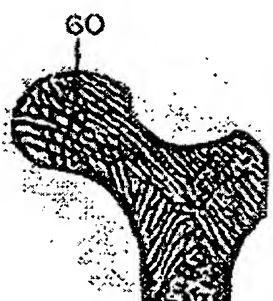


FIG. 21A

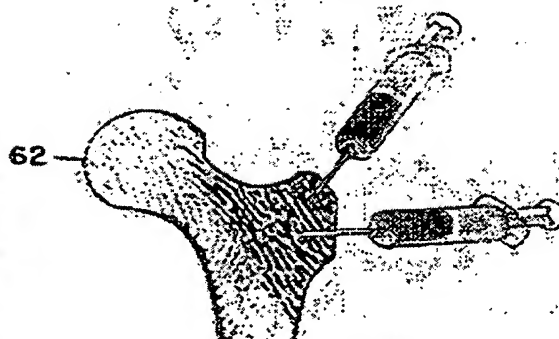


FIG. 21B

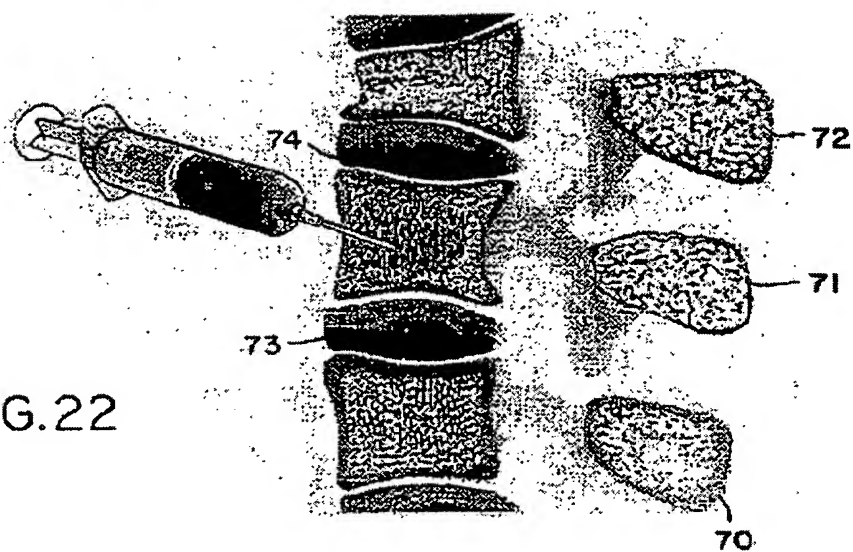


FIG. 22

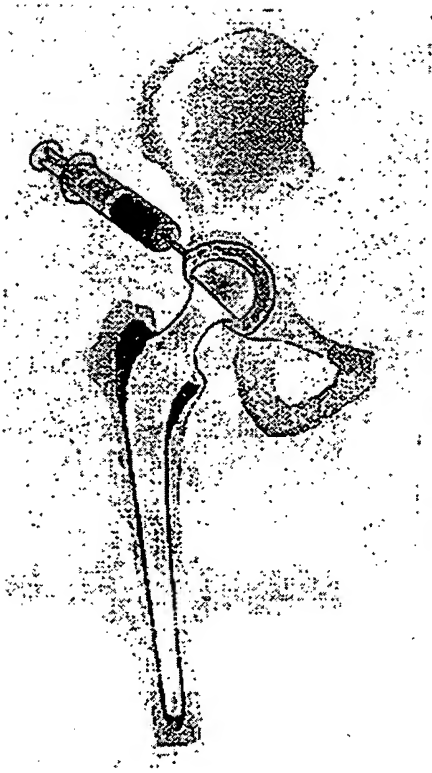


FIG. 23

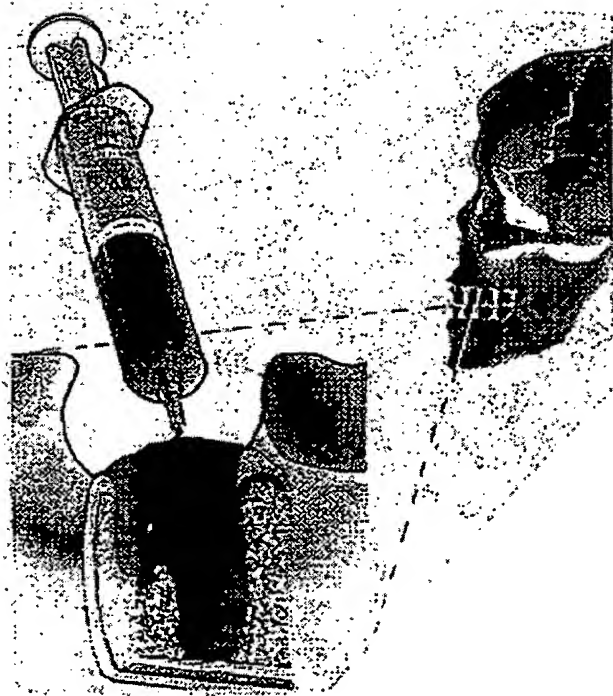


FIG. 24

FIG. 25





FIG. 26



FIG.27

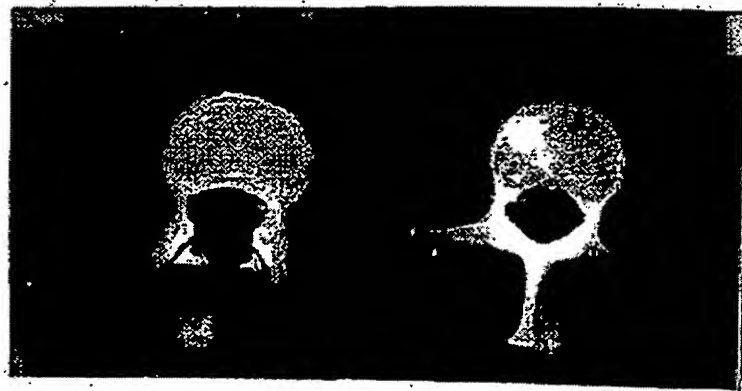
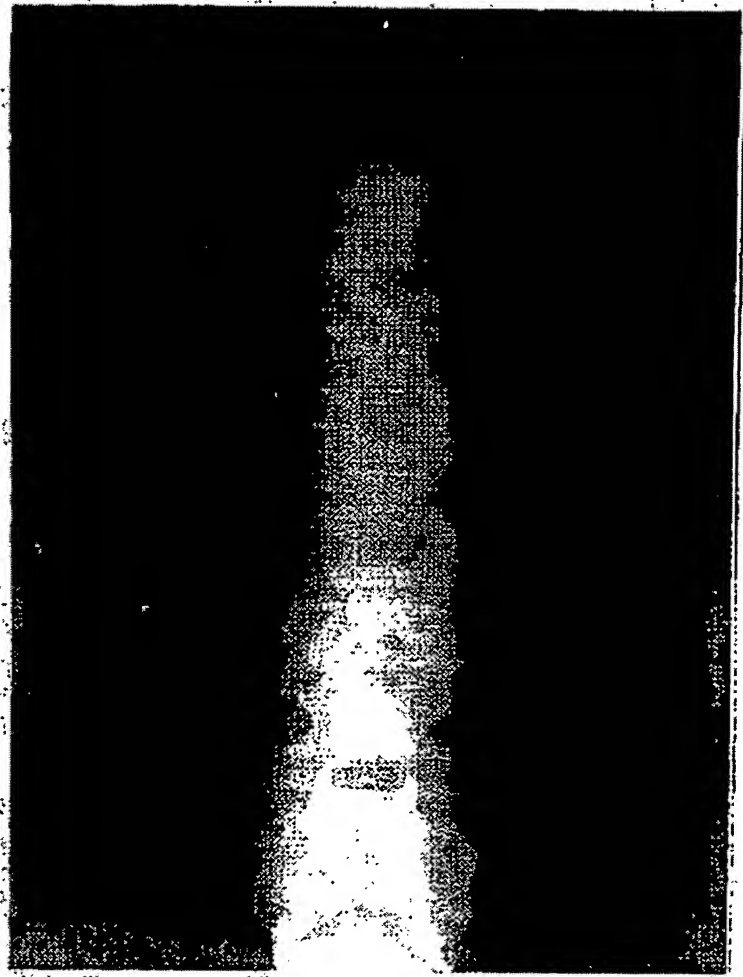


FIG.28A

FIG. 28B